

Die in vitro-Kultur menschlicher Leukozyten  
als Testsystem für Chromosomenmutationen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde  
vorgelegt dem Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin

von

Dipl.-Biol. Bernd Beek

aus Berlin

1977



Die in vitro-Kultur menschlicher Leukozyten  
als Testsystem für Chromosomenmutationen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde  
vorgelegt dem Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin

von

Dipl.-Biol. Bernd Beek

aus Berlin



Erster Referent:

Prof. Dr. G. Obe

Zweiter Referent:

Prof. Dr. K. Sperling

Tag der Promotion:

6.4.1977

## I N H A L T

|                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I. EINLEITUNG .....                                                                                | 5   |
| II. MATERIAL UND METHODE .....                                                                     | 15  |
| III. VERSUCHSAUFBAU UND ERGEBNISSE .....                                                           | 22  |
| 1) DNS-Replikation von Subpopulationen ....                                                        | 22  |
| 2) Sensitivitäten von Subpopulationen<br>nach Chemomutagenbehandlung .....                         | 29  |
| 3) Sensitivitäten von Subpopulationen<br>nach Röntgenbestrahlung .....                             | 35  |
| 4) Das RNS-Synthese-Muster der<br>2-Tage-Kultur .....                                              | 59  |
| 5) Strahlensensitivität und Aberrations-<br>spektrum verschiedener Zellzyklus-<br>stadien .....    | 76  |
| 6) Vorzeitige Chromosomenkondensation<br>(PCC) nach Induktion von Chromosomen-<br>mutationen ..... | 93  |
| 7) Differenzierung von Schwesterchroma-<br>tiden durch BUdR-Markierung .....                       | 122 |
| IV. DISKUSSION .....                                                                               | 134 |
| 1) Subpopulationen in menschlichen<br>Leukozytenkulturen .....                                     | 134 |
| 2) Das RNS-Synthese-Muster der<br>2-Tage-Kultur .....                                              | 150 |
| 3) Zusammenfassende Charakterisierung<br>des Ham's F-10 Kultursystems .....                        | 154 |
| 4) Strahlensensitivität und Aberrations-<br>spektrum verschiedener Zellzyklus-<br>stadien .....    | 157 |

|                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5) Vorzeitige Chromosomenkondensation<br>(PCC) nach Induktion von Chromosomen-<br>mutationen ..... | 168 |
| 6) Differenzierung von Schwesterchroma-<br>tiden durch BUdR-Markierung .....                       | 173 |
| V. ZUSAMMENFASSUNG .....                                                                           | 177 |
| VI. LITERATUR .....                                                                                | 181 |

## I. Einleitung

Die in vitro-Kultur menschlicher Leukozyten ist in zweierlei Hinsicht von erheblicher Bedeutung für die Mutationsforschung: Bis heute liefert sie die einzige praktikable Möglichkeit zur Erfassung beim Menschen induzierter Schädigungen des genetischen Materials. Zum anderen stellt die Leukozytenkultur wegen einiger Besonderheiten gegenüber allen anderen Gewebekulturen ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung einer Reihe grundlegender Probleme der Induktion und Manifestation von Chromosomenmutationen dar.

Die Gefahren einer genetischen Schädigung des Menschen durch sogenannte "Umweltmutagene", durch Insektizide, Medikamente, etc., werden seit einiger Zeit zu Recht mit besonderer Intensität untersucht und diskutiert (siehe z.B. FISHBEIN et al., 1970; HOLLAENDER, 1971; OBE et al., 1971; United Nations Report, 1969). Im Rahmen dieser Problematik hat die menschliche Leukozytenkultur seit Jahren einen festen Platz als cyto-genetisches Testsystem, das die Untersuchung beim Menschen induzierter Chromosomenmutationen gestattet. Chromosomenmutationen spielen bei der genetischen Gefährdung künftiger Generationen, die hier im Vordergrund des Interesses steht, keine erhebliche Rolle. Aus populationsgenetischer Sicht sind in diesem Zusammenhang Punktmutationen, besonders die rezessiven Letalmutationen von Bedeutung. Die meisten, wenn nicht alle Mutagene, die Chromosomenmutationen induzieren, erhöhen jedoch ebenfalls die Raten von Punktmutationen (siehe AUERBACH, 1973; FISHBEIN et al., 1970). Chromosomenmutationen sind daher Indikatoren auch in

cytogenetischen Testsystemen nicht direkt erfaßbarer Schädigungen des genetischen Materials.

Unabdingbare Voraussetzung für die Verwendung von Leukozytenkulturen als Testsystem für Chromosomenmutationen ist die Stimulierung dieser immunkompetenten Zellen durch geeignete Antigene in vitro. Zumindest bei cytogenetischen Untersuchungen wird überwiegend das Glykoprotein Phytohämagglutinin (PHA) aus Phaseolus vulgaris als Antigen verwendet, dessen mitogene Wirkung 1960 von NOWELL entdeckt wurde. Die kleinen Lymphozyten des peripheren Blutes, Zellen mit stark kondensiertem, genetisch weitgehend inertem Chromatin und nur wenig Zytoplasma, treten im Verlauf einer Antigen-Antikörperreaktion aus einem Ruhestadium ( $G_0$ -Stadium) in den autosynthetischen Zellzyklus ein und können mehrere Zellteilungen in vitro durchlaufen. Eine derartige Transformation tritt spontan nur äußerst selten auf (siehe LING und KAY, 1975), so daß eine in vitro-Kultivierung dieser Leukozyten in geeigneten Nährmedien der Analyse auf Chromosomenaberrationen in jedem Fall vorausgehen muß.

Beim in vivo-Test werden Leukozytenmetaphasen auf chromosomale Schädigungen untersucht, die im Organismus ("in vivo") meist während einer Therapie, bzw. durch Unfall oder Mißbrauch induziert worden sind. Im Gegensatz zu den "echten" in vivo-Untersuchungen, etwa nach Darstellung von Mitosen aus dem Knochenmark, liefert der sogenannte in vivo-Leukozytentest nur nach konsequenter Einhaltung bestimmter Bedingungen, die weiter unten diskutiert werden sollen, ein realistisches Bild der im Organismus induzierten Chromosomenschäden. Bei der Beurteilung einer potentiellen genetischen Gefährdung spielt darüberhinaus die Extrapolation von diesen

somatischen auf die generativen Zellen der Keimbahn, sowie die Dosis der in Frage stehenden Noxe eine entscheidende Rolle. Es würde den Rahmen dieser Einleitung bei weitem übersteigen, auf die Probleme der Extrapolation von somatischen auf generative Zellen auch nur umrißhaft einzugehen. Zumindest für den Bereich der ionisierenden Strahlen sei auf eine neueste Übersicht von SCHALET und SANKARANARAYANAN (1976), sowie SANKARANARAYANAN (1976 a,b) verwiesen. Eine optimale Dosisabschätzung bei in vivo-Untersuchungen am Menschen kann in sogenannten "prospektiven" Analysen vorgenommen werden, die hauptsächlich auf die Untersuchung von Therapeutika beschränkt sind. Leukozytenmetaphasen können hierbei vor Therapiebeginn und zu verschiedenen Zeiten während der Therapie auf chromosomale Schädigungen untersucht werden. Die Ausgangsdosis des Therapeutikums ist durch den Therapieerfolg vorgegeben, die aktuelle Substanzkonzentration im Blut, soweit es sich um ein chemisches Therapeutikum handelt, sowie relevante "Background"-Faktoren sind zumeist kontrollierbar bzw. bekannt. Derartige Analysen gestatten bei ausreichendem Umfang eine eindeutige Beantwortung der Frage nach einem möglichen chromosomenschädigenden Effekt einer Behandlung in therapeutischen Dosen und eventuell auch die Erstellung von Dosis- bzw. Zeit-Effektbeziehungen. Nach unbeabsichtigter Kontamination mit mutagenen Noxen (z.B. Strahlenunfälle), oder etwa nach Drogenmißbrauch sind lediglich "retrospektive" Analysen möglich. Die Interpretation in derartigen Untersuchungen gewonnener Daten ist problematisch, vor allem, weil keine Kontrollwerte derselben Personen vor Kontamination erhalten werden konnten (zum Problem "prospektive - retrospektive" in vivo-Untersuchungen siehe OBE et al., 1976 a).

Der reine in vitro-Test auf Chromosomenaberrationen, die Untersuchung eines potentiellen Mutagens nach Behandlung der Zellen in Kultur ("in vitro"), kann lediglich als Vortest bewertet werden. Hier ist von vornherein zu erwarten, daß Mutagene, die erst der metabolen Aktivierung im intakten Organismus bedürfen ("indirekte Mutagene"), zu negativen Ergebnissen führen. Es gibt zwar Möglichkeiten der in vitro-Aktivierung indirekter Mutagene, jedoch sind diese vorerst für cytogenetische Routinetests zu aufwendig.

Im Hinblick auf eine genetische Gefährdung des Menschen (d.h., die Induktion von Punktmutationen) ist die Aussage cytogenetischer Testsysteme von vornherein eingeschränkt. Es gibt Chemomutagene, die zwar die Raten von Punktmutationen deutlich erhöhen, jedoch zu keiner, oder einer nur schwer nachweisbaren, Erhöhung der Häufigkeiten von Chromosomenmutationen führen (z.B. Diäthylnitrosamin, siehe VOGEL und SOBELS, 1976). Demnach kann aus Ergebnissen cytogenetischer Untersuchungen, die eine Erhöhung der Raten von Chromosomenmutationen zeigen, zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf eine Erhöhung der Raten von Punktmutationen, und damit auf eine genetische Gefährdung, geschlossen werden. Bei Negativbefunden jedoch kann die potentielle Mutagenität der in Frage stehenden Substanz im Hinblick auf Punktmutationen nicht ausgeschlossen werden. Diese Einschränkung der Aussage cytogenetischer Testsysteme bei Negativbefunden erfordert daher bei der Beurteilung der "Mutagenität" einer Noxe die Heranziehung von Testsystemen auf Punktmutationen, wie etwa Drosophila oder auch Mikroorganismen.

Neben ihrer Bedeutung im Rahmen der Problematik einer genetischen Gefährdung der menschlichen Population spielen Mutagenitätstests in zunehmendem Maße eine

Rolle bei der Beurteilung der potentiellen Carcinogenität einer Substanz. Nahezu alle bisher daraufhin untersuchten Carcinogene sind gleichfalls Mutagene, zumindest bei Salmonella (AMES et al., 1973). Tests auf Carcinogenität einer Substanz sind weit- aus aufwendiger und langwieriger als einfache Mutationstests an Mikroorganismen, so daß hierin eine Möglichkeit wenigstens der Vortestung einiger der zahllosen neu auftauchenden Produkte der chemischen Industrie auf carcinogene (=mutagene) Nebenwirkungen gesehen wird. Keineswegs als erwiesen gelten kann jedoch die Annahme, die meisten (oder alle) Mutagene seien auch carcinogen. Offen bleibt ferner, inwieweit an Mikroorganismen gewonnene Ergebnisse auf höhere Organismen übertragbar sind. Das Problem der Übertragbarkeit von Ergebnissen der Mutagenitätsprüfung an verschiedenen Testsystemen auf den Menschen war und ist Gegenstand ausgedehnter Diskussionen und Kontroversen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. Bei der Frage nach einer möglichen genetischen Gefährdung des Menschen scheinen mir von allen bisher verfügbaren Testsystemen im menschlichen in vivo-Leukozyten- test gewonnene positive Ergebnisse die deutlichste Relevanz zu besitzen. Im Falle negativer Befunde müssen jedoch andere Testsysteme herangezogen werden.

Neben ihrer Bedeutung für die Mutagenitätsprüfung können Leukozytenkulturen als Modellsystem eines teilungsaktiven Gewebes angesehen werden, das zur Untersuchung zahlreicher grundlegender Fragestellungen der Induktion und Manifestation von Chromosomenmutationen geeignet ist. Leukozytenkulturen weisen zudem gegenüber allen anderen Zellkulturen

einige Besonderheiten auf, die bei der Untersuchung bestimmter Fragestellungen aus dem genannten Bereich von erheblichem Vorteil sein können. Hier ist vor allem die Stimulierbarkeit dieser Zellen zum Eintritt in einen autosynthetischen Zellzyklus und die relative Synchronie dieses Systems zumindest bis zur ersten Mitose nach Stimulierung zu nennen.

Erscheinungsbild wie Häufigkeit induzierter chromosomaler Aberrationen stehen in engem Zusammenhang mit dem Zellzyklusstadium, in dem die Mutagenbehandlung vorgenommen wurde (EVANS und SCOTT, 1964, 1969; SCOTT und EVANS, 1967; WOLFF, 1968). Hier bietet die Leukozytenkultur als ausreichend definiertes Kultursystem aufgrund der langen Dauer des ersten Zellzyklus nach Stimulierung (annähernd zwei Tage) die Möglichkeit einer detaillierten Analyse derartiger Zusammenhänge nicht nur während verschiedener sondern auch innerhalb einzelner Zellzyklusstadien. Die besonderen physiologischen Gegebenheiten unstimulierter Leukozyten und stimulierter, die in der Transformation von weitgehend inerten zu zellphysiologisch hochaktiven Zellen begriffen sind, eröffnen zahlreiche Möglichkeiten zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen zellphysiologischem Geschehen und Induktion und/oder Manifestation von Chromosomenmutationen. Die zunächst weitgehende Synchronie dieses Kultursystems erübrigt die Anwendung relativ aufwendiger Synchronisierungstechniken, die zudem in diesem Zusammenhang eine unerwünschte Beeinträchtigung darstellen können.

Erscheinungsbild wie Häufigkeit induzierter chromosomaler Aberrationen stehen in engem Zusammenhang mit der Anzahl von Mitosen, d.h. vollständigen Zellzyklen, die zwischen Induktion bzw. Manifestation und Analyse

ablaufen (siehe RIEGER und MICHAELIS, 1967). Chromatidenaberrationen erscheinen in der nächstfolgenden Mitose als Chromosomenaberrationen ("derived aberrations"). Asymmetrische Austauschaberrationen können bei Brückenbildung erneut zu Bruchinduktion und Reunion bzw. Restitution führen (McCLINTOCK, 1951). In teilungsaktiven Geweben unterliegen chromosomal geschädigte Zellen einer Selektion (siehe z.B. BUCKTON und PIKE, 1964), Mikrokerne treten auf, deren Chromatin im Verlauf weiterer Zellteilungen häufig als pulverisiertes oder leiterartig durchbrochenes vorzeitig kondensiertes Chromatin (PCC) neben den Metaphasechromosomen des Hauptkerns zu finden ist (siehe z.B. OBE et al., 1975b).

Der weiten Verbreitung des menschlichen Leukozytenkultursystems entspricht eine Fülle verschiedener Kulturtechniken, die eine Vergleichbarkeit der in verschiedenen Labors erhaltenen Ergebnisse häufig sehr erschweren oder sogar unmöglich machen. Zahlreiche widersprüchliche Befunde im Bereich der Mutagenitätsprüfung wie der Grundlagenforschung könnten durch die Diversität der Testsysteme verursacht sein. Besonders die Verwendung verschiedener Kulturmedien beeinflusst in deutlicher Weise den Zellzyklus stimulierter menschlicher Leukozyten (DUDIN et al., 1974; OBE et al., 1975b; OBE et al., 1976b). Wegen der bereits erwähnten Selektionsmechanismen, die chromosomal geschädigte Zellen in nachfolgenden Zellzyklen eliminieren können, ist die ausschließliche Analyse erster Mitosen nach Aberrationsinduktion für zahlreiche Untersuchungen aus dem Bereich der Grundlagenforschung und für alle Mutagenitätsprüfungen mit dem menschlichen Leukozytentestsystem unbedingte Voraussetzung für korrekte Ergebnisse. Diese Tatsache wird

leider allzu häufig nur unzureichend oder überhaupt nicht berücksichtigt. Ein besonderes Problem bei der Verwendung menschlicher Leukozytenkulturen als Testsystem für Chromosomenmutationen stellen die sogenannten "Subpopulationen" dar. Seit längerem existieren zahlreiche Hinweise auf das Vorliegen wenigstens zweier verschiedener Untergruppen von Zellen in menschlichen Leukozytenkulturen nach Stimulierung mit PHA (JASINSKA et al., 1970; JOHANSEN, 1972; MICHALOWSKI, 1963; STEFFEN und STOLZMANN, 1969). Nach Ansatz menschlicher Leukozytenkulturen mit Ham's F-10 Kulturmedium (HAM, 1963) und Stimulierung mit PHA sind bis zu 54 Stunden nach Kulturbeginn zwei DNS-Synthesemaxima und zwei "Mitosewellen" nachweisbar (DUDIN et al., 1974), die möglicherweise durch unterschiedliche Stimulierungsreaktionen zweier Untergruppen von Leukozyten hervorgerufen werden. Obwohl der Schluß naheliegt, es könnte sich bei diesen beiden Subpopulationen um B- ("bone marrow derived") bzw. T- ("thymus derived") Lymphozyten handeln, ist nach Ergebnissen von LEVIS und ROBBINS (1970) anzunehmen, daß, zumindest innerhalb des genannten Kulturzeitraumes, ausschließlich T-Lymphozyten durch PHA stimuliert werden. Demnach könnte es sich bei den von DUDIN et al. (1974) beschriebenen Subpopulationen um Untergruppen von T-Zellen handeln. Von erheblicher Bedeutung ist nun die Frage möglicher Unterschiede in der Sensitivität dieser beiden Subpopulationen im Hinblick auf die Induktion von Chromosomenaberrationen. Derartige Unterschiede könnten, besonders in Kombination mit den bekannten zellzyklusverzögernden Effekten von Mutagenbehandlungen, für eine Fülle widersprüchlicher und unklarer Ergebnisse bei der Verwendung des menschlichen Leukozytentestsystems verantwortlich sein. Untersuchungen von BENDER und BREWEN (1969), sowie STEFFEN und MICHALOWSKI (1973)

lieferten bereits Hinweise auf eine unterschiedliche Sensitivität von Subpopulationen in menschlichen Leukozytenkulturen nach Röntgenbestrahlung.

In der vorliegenden Arbeit wird in Anknüpfung an die Befunde von DUDIN et al. (1974) unter Verwendung des Ham's F-10/PHA Kultursystems zunächst der Versuch unternommen, mehr Information über Subpopulationen in menschlichen Leukozytenkulturen zu erhalten. Als erstes wird mit Hilfe der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Autoradiographie untersucht, ob die angenommene zeitliche Trennung im Hinblick auf DNS-Synthese und Mitose der beiden Subpopulationen (DUDIN et al., 1974) experimentell bestätigt werden kann (III.1). Danach wird die Frage möglicher Sensitivitätsunterschiede nach Chemomutagenbehandlung (III.2), sowie nach Röntgenbestrahlung (III.3) bearbeitet. Der weiteren Charakterisierung des vorliegenden Kultursystems soll eine Untersuchung des RNS-Synthesemusters der 2-Tage-Kultur dienen (III.4). Im Anschluß an die genannten Experimente, die im weiteren Sinne den Aufbau eines definierteren Kultursystems ermöglichen sollen, werden Strahlensensitivität und Aberrationsspektrum menschlicher Leukozyten nach Röntgenbestrahlung zu verschiedenen Zeiten innerhalb des ersten Zellzyklus nach PHA-Stimulierung ermittelt (III.5). Der Zusammenhang zwischen Induktion von Chromosomenaberrationen in teilungsaktiven Zellen, Mikrokernbildung und dem Auftreten vorzeitig kondensierten Chromatins als Konsequenz ist Gegenstand der darauffolgenden Untersuchung (III.6). In den abschließenden Experimenten (III.7) werden mit Hilfe einer neueren Methode zur Differenzierung von Schwesterchromatiden die Häufigkeiten erster, zweiter und dritter Mitosen nach dreitägiger Kulturdauer, sowie die Raten von

Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) nach Chemomutagen- bzw. Bleiacetatbehandlung ermittelt.

Die in dieser Arbeit vorgenommene Darstellung der Ergebnisse unmittelbar nach Angabe des jeweiligen Versuchsaufbaus soll dem engen Zusammenhang zwischen experimentellem Ansatz und möglicher Aussage Rechnung tragen.

## II. Material und Methode

### II. 1) Leukozytenkultur

Alle Experimente wurden mit einer modifizierten Mikroblutkulturmethode nach ARAKAKI und SPARKES (1963) durchgeführt. Das benötigte periphere Venenblut stammte von verschiedenen klinisch normalen Blutspendern. Innerhalb geschlossener Experimente wurde nur Blut jeweils eines Blutspenders verwendet (siehe Verzeichnis der Blutspender II.6).

#### Ansatz und Kultur

Eine Standard-Leukozytenkultur enthält:

- a) 4,00 ml Ham's F-10 Medium (Bio-cult Laboratories, Glasgow; HAM, 1963)
- b) 0,50 ml (ca. 10%) Fötales Kälberserum (Microbiological Associates, Inc., Bethesda, Maryland)
- c) 0,12 ml Phytohämagglutinin M (Difco)
- d) 0,02 ml Penicillin/Dihydrostreptomycin-Gemisch (1 mg Dihydrostreptomycin und 100 I.E. Penicillin)
- e) 0,40 ml peripheres Venenblut

Das periphere Venenblut wurde mit einer heparinisierten sterilen Einwegspritze der Armvene des Blutspenders entnommen. Je nach Experiment wurden in sterilen Glasflaschen, verschließbaren Einwegzentrifugenröhrchen oder Einwegspritzen unterschiedliche Mengen dieser Standardkultur im Brutschrank (37°C) inkubiert. Die Kulturdauer entsprach der Fragestellung der einzelnen Versuche. Zur Anreicherung

von Metaphasen wurde in einigen Experimenten 0,10 ml einer 0,002%igen Colcemidlösung (Ciba) pro Standardkulturmenge hinzugegeben.

### Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der Leukozytenkultur umfaßt folgende Arbeitsgänge:

- a) Entfernen des Kulturmediums durch Zentrifugieren (10 Min. bei ca. 800 U/Min.; entspricht ca. 300 g) und Absaugen des Überstandes mit einer Wasserstrahlpumpe.
- b) Hypotoner Schock. Zellsediment in 2,00 ml einer 0,075 M KCl-Lösung resuspendieren und 7 Min. bei Zimmertemperatur inkubieren.
- c) Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes (wie a)
- d) Fixieren der Zellen durch Resuspendieren des Sedimentes in 2,00 ml Methanol/Eisessig (3:1).
- e) Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes (wie a)
- f) Erneute Resuspension des Sedimentes in Fixiergemisch; Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes (wie a, gegebenenfalls mehrmals wiederholen).
- g) Auftropfen der Zellsuspension (in Fixiergemisch) auf fettfreie, eisgekühlte Objektträger.
- h) Präparate lufttrocknen.

### Färbung

Die Präparate wurden entweder mit Orcein oder mit Giemsa-Farblösung gefärbt:

#### Orceinfärbung

- a) Einstellen der Objektträger in eine 2%ige Orcein-Essigsäure-Lösung (65% Essigsäure + 2% Orcein) für 45-90 Min.
- b) Spülen in absolutem Alkohol.
- c) Lufttrocknen.

### Giemsafärbung

- a) Einstellen der Objektträger in ein Giemsa/Phosphatpuffer-Gemisch (Giemsa-Stammlösung/Phosphatpuffer, pH 6,88; 0,0025 M; 1:10) für 10 Min.
- b) Spülen in Aqua dest.
- c) Lufttrocknen.

### Auswertung

Zur Auswertung der Präparate wurde ein Leitz-Mikroskop mit Ölimmersionsobjektiv (100 fach) verwendet. Mikrofotographien wurden mit einem Zeiss-Fotomikroskop angefertigt.

## II. 2) Autoradiographie

In verschiedenen Experimenten wurden radioaktiv markierte Nukleotide zum Nachweis der DNS- und RNS-Synthese verwendet. Zum Nachweis der DNS-Synthese wurde 1  $\mu\text{Ci/ml}$  Kulturflüssigkeit (Methyl)  $^3\text{H}$ -Thymin ( $^3\text{H}$ -TdR; Radiochemical Center, Amersham; spezifische Aktivität: 2 Ci/mM) den Leukozytenkulturen hinzugegeben, zum Nachweis der RNS-Synthese 1  $\mu\text{Ci/ml}$  Kulturflüssigkeit  $^3\text{H}$ -Uridin ( $^3\text{H}$ -UR; Radiochemical Center, Amersham; spezifische Aktivität: 26 Ci/mM). Außer kontinuierlicher Markierung wurde in einzelnen Experimenten  $^3\text{H}$ -TdR nur eine bestimmte Zeit zur Inkorporation angeboten (Pulsmarkierung). Nach Pulsmarkierung wurde der "Tracer" unter Verwendung von nicht-markiertem ("kaltem") Thymin (Endkonzentration:  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ) in Hank's isotoner Salzlösung ausgewaschen.

Bei der Handhabung und Aufarbeitung derartiger Leukozytenkulturen wurden die für das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen vorgeschriebenen Sicherheitsbestimmungen berücksichtigt.

Die Befilmung der Präparate erfolgte mit Kodak Nuclear

Track Emulsion, NTB 3, bei schwachem Rotlicht (Kodak "Wratten" Safelight, Series 1). Die Präparate wurden 3 Std. in einer Trocknungsapparatur belüftet und danach in lichtundurchlässiger Verpackung, die zur Aufnahme von Feuchtigkeit zusätzlich etwas  $\text{CaCl}_2$  enthielt, für 3 Wochen bei  $4^\circ\text{C}$  exponiert.

Nach dem Exponieren wurden die Autoradiographien wie folgt entwickelt:

- a) 2 Min. entwickeln in Kodak D-19 b bei  $20^\circ\text{C}$ .
- b) 30 Sek. spülen in Leitungswasser.
- c) 20 Min. wässern und anschließend lufttrocknen.

## II. 3) BUdR-Markierung

Eine neuere Methode zur Differenzierung von Schwesterchromatiden beruht auf der Substitution von Thymin in der DNS durch das Basenanalogon Bromdesoxyuridin (BUdR). Hierzu ist es nötig, daß, im Gegensatz zur autoradiographischen Markierung mit  $^3\text{H}$ -TdR, Zellen BUdR in zwei aufeinander folgenden DNS-Synthesephasen des Zellzyklus inkorporieren. Anschließend DNS-De- und Renaturierung führt zu unterschiedlicher Anfärbbarkeit der Chromatiden mit Giemsa-Farbe: Diejenige Chromatide, in der Thymin in beiden DNS-Einzelsträngen durch BUdR ersetzt ist, läßt sich nur schwach anfärben, während die nur in einem Einzelstrang substituierte DNS eine normale Anfärbbarkeit der Chromatide zuläßt. Mit Hilfe dieser Methode können unter anderem Mitosefolgen und Schwesterchromatidenaustausche (SCE) untersucht werden.

Die für BUdR-Markierungsexperimente vorgesehenen Standardleukozytenkulturen wurden in Glasflaschen angesetzt, die zum Lichtschutz mit Aluminiumfolie umwickelt waren, da sonst Photolyse BUdR-substituierter DNS eintreten kann

(IKUSHIMA und WOLFF, 1974). Eine BUdR-Lösung wurde 24 Std. nach Kulturanatz zugegeben. Vor diesem Zeitpunkt ist autoradiographisch eine DNS-Synthese in diesem Kultursystem nicht nachweisbar (DUDIN et al., 1974). Die Endkonzentration in der Kultur betrug  $10^{-5}$ M.

Nach Aufarbeitung in der üblichen Weise (s.o.) müssen die Präparate einige Tage altern, damit die ansonsten häufig auftretende Giemsa-Bandenmusterbildung unterbleibt. Die anschließend vorgenommenen DNS- De- und Renaturierungen erfolgten nach der von KORENBERG und FREEDLENDER (1974) entwickelten Methode unter Verwendung von  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung bei pH 8,0 und 88°C. Eine 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung wird mit festem NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Diese Lösung wird in einem Wasserbad auf 88°C in einer Küvette erhitzt, in die nach Erreichen der gewünschten Temperatur die Objektträger für 4 Min. eingestellt werden. Anschließend werden die Präparate in Aqua dest. gespült und in Giemsa-Farblösung gefärbt (Giemsa-Stammlösung/Aqua dest.; 1 : 50). Die Präparate werden danach erneut in Aqua dest. gespült und an der Luft getrocknet.

#### II. 4) Nachweis von kinetochornahem Heterochromatin

Zum Nachweis von kinetochornahem Heterochromatin wurden Präparate nach der von SUMNER (1972) angegebenen Methode behandelt:

- a) Einstellen der Präparate für 1 Std. bei Zimmertemperatur in 0,2 N HCl.
- b) Spülen in Aqua dest.
- c) Einstellen der Präparate für ca. 8 Min. in eine 5%ige  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8 \text{H}_2\text{O}$  - Lösung.
- d) Spülen in Aqua dest.
- e) Präparate 1 1/2 Std. in Giemsa/Phosphatpuffer-Gemisch

(Giensa-Stammlösung/Phosphatpuffer pH 6,88; 0,0025 M;  
1 : 50) färben.

f) Spülen in Aqua dest.

g) Lufttrocknen.

## II. 5) Mutagene

Zur Induktion von Chromosomenmutationen wurden je nach Fragestellung Röntgenstrahlen und verschiedene Chemomutagene verwendet.

### Röntgenbestrahlungen

Entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung wurden Standard-Leukozytenkulturen oder Vollblut (in Einwegspritzen) mit einer Müller RT 100 Röntgenröhre bestrahlt. Folgende Bestrahlungsbedingungen gelten für alle Strahlenversuche: 100 kV, 8 mA, 2,0 mm Al-Filter, 58 cm Fokusabstand, Dosisrate pro Min. ca. 30 R, Zimmertemperatur. Die eingestrahlte Dosis wurde mit einem Simplex-Universal Dosimeter mit Mikroschlauchkammer gemessen.

### Chemomutagene und Kontrollsubstanzen

Sämtliche hier verwendeten Chemomutagene und Kontrollsubstanzen wurden in Aqua bidest. unmittelbar vor Zugabe zu den Leukozytenkulturen gelöst und durch Mikrofiltration sterilisiert. Die benötigten Substanzmengen wurden so berechnet, daß die gewünschten Endkonzentrationen in der Kultur nach Zugabe von 0,05 ml, bzw. 0,5 ml der Substanzlösung erreicht wurden.

Folgende Substanzen wurden verwendet:

- A 139; 2,5-bis-(Methoxyäthoxy)-3,6-bis-Äthylenimino-p-Benzochinon, Molekulargewicht: 338,35 , Bayer. Difunktionelles alkylierendes Chemomutagen.

- Trenimon; 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon (1,4),  
Molekulargewicht: 231,26, Bayer. Tri-  
funktionelles alkylierendes Chemomutagen.
- Bleiacetat;  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ , Molekulargewicht:  
379,33.
- Natriumacetat;  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ , Molekulargewicht:  
136,08.

## II. 6) Verzeichnis der Blutspender

| Experiment | Initialen | Alter bei Versuchs-<br>durchführung (Jahre) | Geschlecht |
|------------|-----------|---------------------------------------------|------------|
| III. 1     | GD        | 24                                          | ♀          |
| III. 2     | BB        | 25                                          | ♂          |
| III. 3     | HG        | 22                                          | ♀          |
| III. 4     | BB        | 26                                          | ♂          |
| III. 5     | BB        | 26                                          | ♂          |
| III. 6     | PP        | 34                                          | ♂          |
| III. 7A    | PT        | 34                                          | ♂          |
| III. 7B    | PT        | 34                                          | ♂          |
| III. 7C    | BB        | 26                                          | ♂          |

### III. Versuchsaufbau und Ergebnisse

#### III. 1) DNS-Replikation von Subpopulationen

Die bereits erwähnten Befunde von DUDIN et al. (1974) ließen in dem hier verwendeten Kultursystem eine zweigipflige Verteilung der Häufigkeiten von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus und in der Mitose erkennen. Neben Ergebnissen anderer Autoren (siehe Einleitung) sind besonders diese beiden DNS-Synthese-Maxima und Mitosewellen ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein zweier Subpopulationen von Zellen, von denen angenommen werden könnte, daß sie nacheinander die S-Phase des Zellzyklus durchlaufen, jede für sich relativ synchron, und auf diese Weise Anlaß zur Entstehung zweier Mitosewellen geben, die ebenfalls nacheinander auftreten. Die Berechtigung zu dieser Annahme sollte in den folgenden Experimenten geprüft werden.

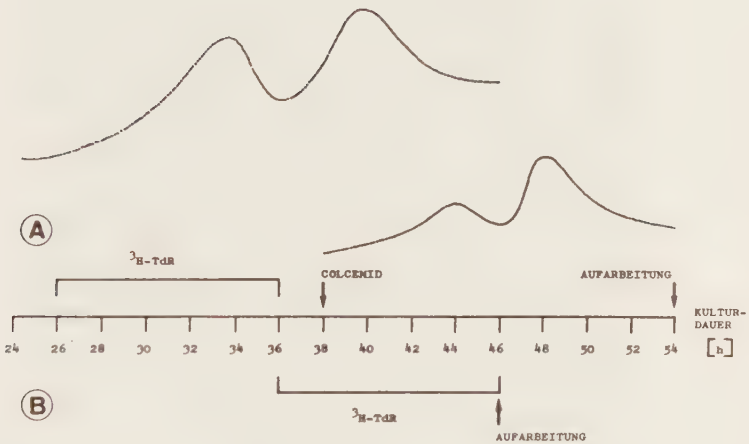
Es wurden Standard-Leukozytenkulturen in Glasflaschen angesetzt und für 54 Std. bzw. 46 Std. kultiviert. In Experiment A erfolgte Pulsmarkierung mit  $^3\text{H}$ -TdR von 26 - 36 Std. nach Kulturbeginn. Nach Auswaschen des Tracers wurde 38 Std. nach Kulturbeginn Colcemid zugegeben und bis zur Aufarbeitung nach 54 Std. in den Kulturen belassen. In Experiment B wurde  $^3\text{H}$ -TdR 36 Std. nach Ansatz zugegeben, keine Colcemidbehandlung durchgeführt und nach 46 Std. aufgearbeitet (siehe Abbildung 1). Nach Aufarbeitung wurden Autoradiographien angefertigt und in Experiment A Mitosen, in Experiment B Interphasen auf Markierung untersucht (siehe Abbildung I und II). Mitosen bzw. Interphasen mit mehr als 10 Silberkörnern über dem Chromatin galten als markiert. Ferner wurden nur solche Interphasen als unmarkiert gewertet, die in der jeweiligen Größenklasse auch in markierten Zellen auftraten ("transformierte Leukozyten").

Die Ergebnisse dieser beiden Experimente sind in Tabelle 1 dargestellt. Es zeigt sich, daß nach  $^3\text{H}$ -TdR-Markierung

der ersten 10 Stunden nachweisbarer DNS-Synthese in diesem Kultursystem und Ansammlung sämtlicher erster Mitosen, die bis 54 Std. nach Kulturbeginn auftreten, ca. 50% aller Mitosen markiert, bzw. 50% aller Mitosen unmarkiert sind. Die Hälfte aller in dem genannten Zeitraum auftretenden Zellen im Mitosestadium (vergl. Abbildung 1) muß also mit der Replikation ihrer DNS bereits zwischen 26 - 36 Std. nach Kulturansatz begonnen haben (markierte Metaphasen), während die andere Hälfte der Zellen erst 36 Std. nach Ansatz in die S-Phase eintritt (unmarkierte Metaphasen). Dieser Befund zeigt, daß die geforderten Charakteristika von Subpopulationen in diesem Kultursystem nachweisbar sind. Zellen der zweiten Population treten offenbar erst ungefähr 10 Std. nach der ersten Population in die S-Phase des Zellzyklus ein. Nach den Ergebnissen von Experiment A sind die Anteile beider Populationen an mitotischen Zellen in dem untersuchten Zeitraum annähernd gleich groß.

In Experiment B wurde der komplementäre Versuchsansatz, die Markierung von Zellen der (vermuteten) zweiten Subpopulation, angewendet. Hierbei war jedoch zu berücksichtigen, daß im Zeitraum von 36 - 46 Std. nach Kulturbeginn, im Bereich des zweiten DNS-Synthese-Maximum, bereits Mitosen ablaufen. Die Colcemidzugabe müßte also kurz nach der Zugabe von  $^3\text{H-TdR}$  erfolgen, das  $^3\text{H-TdR}$ -haltige Medium jedoch mit dem Colcemid bereits 10 Stunden vor der Aufarbeitung entfernt werden. Wegen dieser technischen Schwierigkeiten wurde der Versuchsansatz modifiziert: Die  $^3\text{H-TdR}$ -Behandlung erfolgte 36 - 46 Std. (vergl. Abbildung 1), die Aufarbeitung 46 Std. nach Ansatz. Nach der Autoradiographie wurden Interphasekerne auf Markierung ausgewertet. Bei der Beurteilung der in Tabelle 1 (Experiment B) dargestellten Ergebnisse (ca. 35% markierte gegenüber ca. 65% unmarkierten Interphasekernen) müssen die besonderen Bedingungen dieses Versuchs-

ansatzes berücksichtigt werden. Da auf die Colcemid-behandlung verzichtet wurde, laufen die Zellteilungen im Zeitraum von 36 - 46 Std. nach Kulturansatz ungehindert ab und führen damit zur Verdoppelung der Menge unmarkierter Interphasekerne transformierter Leukozyten, da im  $G_2$ -Stadium des Zellzyklus und in der Mitose kein Einbau von  $^3H$ -TdR stattfindet. Es dürfen also nicht die Häufigkeiten der beiden Klassen "markierte - unmarkierte" Interphasekerne miteinander verglichen werden, sondern die Anzahlen markierter mit der Hälfte der Anzahlen unmarkierter Zellen. Demnach entsprechen den 529 markierten Interphasekernen (siehe Tabelle 1)  $978/2 = 489$  unmarkierte. In Bestätigung von Experiment A ergibt sich damit erneut ein Verhältnis von ca. 50% (52,0%) Zellen der ersten zu ca. 50% (48,0%) Zellen der zweiten Population, die nacheinander in Zeiträumen von jeweils ca. 10 Stunden die S-Phase des Zellzyklus durchlaufen.



**Abbildung 1.** Versuchsanordnung in den beiden Experimenten (A und B) zur DNS-Replikation von Subpopulationen. Expt. A: Pulsmarkierung mit  $^3\text{H-TdR}$  von 26 - 36 Std., Zugabe von Colcemid 38 Std. und Aufarbeitung 54 Std. nach Kulturansatz. Auswertung von Metaphasen auf autoradiographische Markierung. Expt. B: Zugabe von  $^3\text{H-TdR}$  36 Std. und Aufarbeitung 46 Std. nach Kulturansatz. Auswertung von Interphasekernen auf autoradiographische Markierung. Die obere gepunktete Kurve stellt das leicht idealisierte DNS-Synthesemuster, die untere die Häufigkeitsverteilung der Mitoseindizes zu den entsprechenden Zeiten nach Kulturbeginn dar (nach DUDIN et al., 1974)

| Experiment | Zelltyp         | Anzahl aus-<br>werteter Zellen | Markierte Zellen |                  | Unmarkierte Zellen |                  |
|------------|-----------------|--------------------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
|            |                 |                                | Total            | % $\pm m$        | Total              | % $\pm m$        |
| A          | Mitose          | 650                            | 324              | 49,80 $\pm 1,96$ | 326                | 50,20 $\pm 1,96$ |
| B          | Inter-<br>phase | 1507                           | 529              | 35,10 $\pm 1,23$ | 978                | 64,90 $\pm 1,23$ |

Tabelle 1. Häufigkeiten markierter und unmarkierter Metaphasen nach  $^3\text{H}$ -TdR Pulsmarkierung (Expt. A) von 26 - 36 Std., Colcemidbehandlung von 38 - 54 Std. und Aufarbeitung 54 Std. nach Ansatz, sowie Häufigkeiten markierter und unmarkierter Interphasekerne (Expt. B) nach Zugabe von  $^3\text{H}$ -TdR nach 36 Std. und Aufarbeitung 46 Std. nach Ansatz. Prozentsätze  $\pm$  mittlerer Fehler (m)



Abbildung I. Autoradiographisch markierte ( $^3\text{H}$ -TdR) und unmarkierte Interphasekerne verschiedener Größe



Abbildung II. Autoradiographisch markierte Metaphaseplatten nach Inkorporation von  $^3\text{H}$ -TdR für die Dauer einer S-Phase. Die Markierung beider Chromatiden der Chromosomen liefert, entsprechend der semikonservativen Verteilung neusynthetisierter DNS, den Nachweis dafür, daß die vorliegenden Mitosen erste Mitosen nach Pulsmarkierung sind

### III.2) Sensitivitäten von Subpopulationen nach Chemo- mutagenbehandlung

Aus dem Nachweis von Subpopulationen in menschlichen Leukozytenkulturen und deren Charakterisierung im Hinblick auf die zeitlichen Zusammenhänge von DNS-Replikation und Zellteilung ergibt sich die Möglichkeit einer direkten Untersuchung der Sensitivitäten der beiden Subpopulationen nach Induktion von Chromosomenmutationen mit einem Chemomutagen.

Das Versuchsprinzip ist hierbei folgendes:

Die zeitliche Trennung der S-Phasen der beiden Subpopulationen in diesem Kultursystem ermöglicht eine alternierende Behandlung beider Subpopulationen in demselben Zellzyklusstadium, der S-Phase. Damit können "vorgetäuschte" Sensitivitätsunterschiede, die sich aus unterschiedlicher Empfindlichkeit verschiedener Zellzyklusstadien nach Chemomutagenbehandlung ergeben könnten, ausgeschlossen werden. Für einen direkten Vergleich der Aberrationsraten beider Subpopulationen muß zusätzlich eine Möglichkeit gefunden werden, Zellen, die in der S-Phase des Zellzyklus mit dem Chemomutagen behandelt wurden, später im Präparat zu identifizieren. Hier bietet sich, bei Mutagenbehandlung in der S-Phase, die gleichzeitige Markierung der Zellen durch Inkorporation von  $^3\text{H}$ -TdR als Nachweismethode an. Günstig ist zudem, daß anhand des typischen Markierungsmusters der Chromatiden nach Pulsmarkierung für die Dauer einer S-Phase eine eindeutige Identifizierung als erste Mitose nach Pulsmarkierung (und damit auch nach Mutagenbehandlung) ermöglicht wird. Eine exakte Erfassung der Raten chromosomaler Aberrationen ist nur durch Analyse ausschließ-  
lich erster Mitosen nach Aberrationsinduktion möglich. Bei der Planung des Versuchsaufbaues war schließlich eine Abschätzung des durch die Mutagenbehandlung zu erwartenden zellzyklusverzögernden Effektes nötig, damit ausreichende

Mengen von Metaphasen der jeweils behandelten Subpopulation analysiert werden konnten. Die für das hier verwendete Mutagen zu erwartende Zellzyklusverzögerung wurde nach Ergebnissen aus Vorversuchen geschätzt.

Es wurden 6 Leukozytenkulturen im Verhältnis 8,0 ml Kulturflüssigkeit zu 0,4 ml Vollblut in Glasflaschen angesetzt (doppelte Mediummenge der Standard-Leukozytenkultur). In Experiment A (3 Parallelkulturen) wurden die Kulturen 26 Std., in Experiment B (3 Parallelkulturen) 36 Std. nach Ansatz in Zentrifugenröhrchen umgefüllt, in einer vorgewärmten (37°C) Thermozyentrifuge 10 Min. bei ca. 800 U/Min. abzentrifugiert. Pro Kultur wurden dann 4,0 ml der überstehenden Kulturflüssigkeit mit sterilen Einwegspritzen abgesaugt und 10 Std. lang im Brutschrank (37°C) aufbewahrt. Die Zellsedimente wurden in den verbleibenden 4,0 ml Kulturflüssigkeit resuspendiert, in vorgewärmte Kulturflaschen übertragen und unmittelbar danach das Chemosensibilisierendes Mutagen A 139 (Endkonzentration:  $10^{-6}$  M), sowie  $^3\text{H}$ -TdR dazugegeben. Die Mutagenbehandlung und gleichzeitige  $^3\text{H}$ -TdR-Markierung setzte also in Experiment A 26 Std. und in Experiment B 36 Std. nach Kulturansatz ein. Jeweils 10 Stunden danach (Expt. A = 36 Std., Expt. B = 46 Std.) wurde A 139 und  $^3\text{H}$ -TdR aus den Kulturen durch mehrmaliges Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes entfernt. Hierbei wurde eine isotone Salzlösung (Hank's BSS) verwendet, die unmarkiertes ("kaltes") Thymidin enthielt. Nach dem Auswaschen wurde das Zellsediment in dem aufbewahrten konditionierten Reservemedium resuspendiert. Die Zugabe von Colcemid erfolgte 38 Std. (Expt. A), bzw. 48 Std. (Expt. B) und die Aufarbeitung 54 Std. (Expt. A), bzw. 64 Std. (Expt. B) nach Kulturbeginn. Der Versuchsaufbau der beiden Experimente ist in Abbildung 2 dargestellt.

In Orcein-gefärbten Präparaten wurden pro Experiment 300 Metaphasen (nach Möglichkeit 100 Metaphasen pro Parallelserie) auf Chromatidentranslokationen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 2 dargestellt. In Experiment A fanden sich ca. dreimal mehr Chromatidentranslokationen als in Experiment B.

Nach der Auswertung wurden Autoradiographien angefertigt und dieselben Metaphasen, die in den einzelnen Serien auf Chromatidentranslokationen untersucht wurden, auf autoradiographische Markierung hin untersucht. Als im Sinne des beschriebenen Versuchsansatzes "markierte" Metaphasen galten nur solche, bei denen beide Chromatiden der Chromosomen in homologen Regionen markiert waren (erste Mitosen nach Pulsmarkierung und Aberrationsinduktion).

Die Raten von Chromatidentranslokationen in den beiden Experimenten A und B in markierten ersten Mitosen nach Aberrationsinduktion sind in Tabelle 3 angegeben. In Metaphasen der ersten Population (markierte Metaphasen in Experiment A) wurden ca. dreimal mehr Translokationen gefunden als in Metaphasen der zweiten Population (markierte Metaphasen in Experiment B). Im Hinblick auf die Induktion von Chromatidentranslokationen ist die erste Population demnach dreimal empfindlicher als die zweite. Außer Chromatidentranslokationen wurden offene Chromatidenaberrationen (Chromatidenbrüche und Isochromatidenbrüche) gefunden, jedoch nicht quantifiziert, da eine exakte Bestimmung der Häufigkeiten wegen ihrer großen Zahl besonders in Experiment A nicht möglich war. Offene Chromatidenaberrationen traten in Experiment A jedoch ebenfalls eindeutig häufiger auf als in Experiment B.

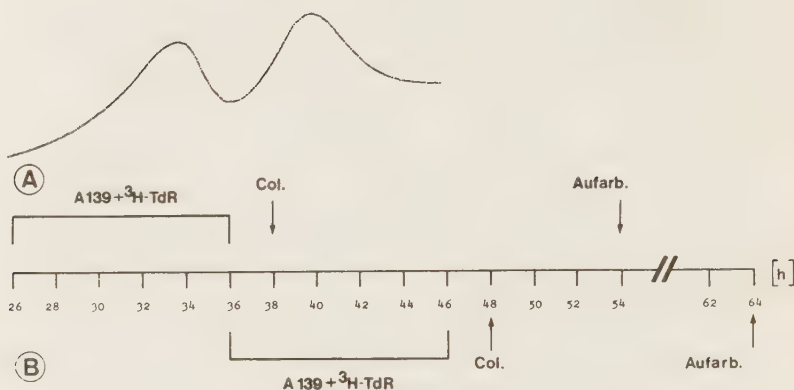


Abbildung 2. Versuchsanordnung in den beiden Experimenten (A und B) zur Untersuchung der Sensitivitäten von Subpopulationen nach Chemomutagenbehandlung.

Expt. A: Gleichzeitige Mutagenbehandlung mit A 139 und Pulsmarkierung mit  $^3\text{H}$ -TdR von 26 - 36 Std. nach Ansatz; Zugabe von Colcemid 38 Std. und Aufarbeitung 54 Std. nach Ansatz. Expt. B: Gleichzeitige Mutagenbehandlung mit A 139 und Pulsmarkierung mit  $^3\text{H}$ -TdR von 36 - 46 Std. nach Ansatz; Zugabe von Colcemid 48 Std. und Aufarbeitung 64 Std. nach Ansatz. Die gepunktete Kurve stellt das leicht idealisierte DNS-Synthesemuster zu den entsprechenden Zeiten nach Kulturbeginn dar (nach DUDIN et al., 1974)

| Experiment<br>(Serie) | Anzahl<br>Mitosen | Chromatidentranslokationen |          |            |
|-----------------------|-------------------|----------------------------|----------|------------|
|                       |                   | Total                      | %Mitosen | pro Platte |
| A                     |                   |                            |          |            |
| (1)                   | 150               | 210                        | 74,00    | 1,400      |
| (2)                   | 100               | 101                        | 56,00    | 1,010      |
| (3)                   | 50                | 72                         | 76,00    | 1,440      |
| Total A               | 300               | 383                        | 67,67    | 1,240      |
| B                     |                   |                            |          |            |
| (1)                   | 100               | 42                         | 29,00    | 0,420      |
| (2)                   | 100               | 43                         | 33,00    | 0,430      |
| (3)                   | 100               | 50                         | 39,00    | 0,500      |
| Total B               | 300               | 135                        | 33,67    | 0,450      |

Tabelle 2. Häufigkeiten von Chromatidentranslokationen nach

Behandlung von Leukozytenkulturen mit A 139 und

<sup>3</sup>H-TdR in Experiment A und B. Versuchsansatz siehe

Abbildung 2

| Experiment<br>(Serie) | Anzahl mar-<br>kierter<br>Mitosen | Chromatidentranslokationen in<br>markierten Mitosen |          |            |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|----------|------------|
|                       |                                   | Total                                               | %Mitosen | pro Platte |
| A                     |                                   |                                                     |          |            |
| (1)                   | 147                               | 207                                                 | 74,15    | 1,410      |
| (2)                   | 86                                | 96                                                  | 62,79    | 1,120      |
| (3)                   | 48                                | 68                                                  | 72,00    | 1,320      |
| Total A               | 281                               | 371                                                 | 70,46    | 1,320      |
| B                     |                                   |                                                     |          |            |
| (1)                   | 60                                | 25                                                  | 26,67    | 0,420      |
| (2)                   | 96                                | 39                                                  | 31,25    | 0,410      |
| (3)                   | 99                                | 50                                                  | 39,39    | 0,510      |
| Total B               | 255                               | 114                                                 | 33,33    | 0,450      |

Tabelle 3. Häufigkeiten von Chromatidentranslokationen in markierten

Mitosen von Experiment A und B nach Behandlung von Leuko-  
zytenkulturen mit A 139 und  $^3\text{H}$ -Tdr. Versuchsansatz siehe

Abbildung 2

### III. 3) Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung

Bei der Untersuchung der Sensitivitäten von Subpopulationen nach Induktion von Chromosomenmutationen durch Röntgenstrahlen ist ein Versuchsansatz, wie er für die Induktion mit einem Chemomutagen beschrieben wurde, nicht sinnvoll. (1) Eventuell vorliegende geringe Schwankungen der Dauer der einzelnen Stadien des Zellzyklus in transformierten Leukozyten in diesem Kultursystem (DUDIN et al., 1974) gestatten bei der kurzen Bestrahlungszeit keine genau definierte und reproduzierbare Behandlung innerhalb eines bestimmten Zellzyklusstadiums. Sensitivitätsunterschiede innerhalb einzelner Zellzyklusstadien sind nicht auszuschließen, so daß nach Alternativbestrahlung und -markierung in der S-Phase scheinbare Sensitivitätsdifferenzen zwischen Subpopulationen als Ergebnis von Sensitivitätsunterschieden von Zellzyklusstadien auftreten könnten. (2) Bei Bestrahlung in der S-Phase ist eine komplexe, schwer zu beurteilende Mischung chromosomaler und chromatidaler Aberrationen zu erwarten.

In Umgehung dieser Schwierigkeiten wurde ein Versuchsansatz gewählt, der die gleichzeitige Bestrahlung aller Zellen in einem physiologisch optimal homogenen Zustand, sowie die Zuordnung der analysierten Metaphasen zur ersten oder zweiten Subpopulation ermöglicht.

Für dieses Experiment wurden 24 Kulturen der doppelten Blut- und Mediummenge (doppelte Standard-Kultur) in sterilen, verschließbaren Einwegzentrifugenröhrchen kultiviert. Vor Zugabe zu den Kulturen wurde Vollblut ( $G_0$ -Stadium des Zellzyklus) mit einer mittleren Röntgenstrahlendosis (200 R) bestrahlt. Zur Verringerung zellzyklusverzögernder Effekte der Bestrahlung war die Wahl einer mittleren Dosis, die jedoch ausreichende Aberrations-

häufigkeiten garantiert, nötig.

12 Kulturen ("Experimentalkulturen") wurden im Zeitraum von 25 - 35 Std. nach Kulturansatz mit  $^3\text{H}$ -TdR pulsmarkiert (autoradiographische Markierung von Zellen der ersten Subpopulation). Nach entfernen des  $^3\text{H}$ -TdR-haltigen Mediums 35 Std. nach Ansatz erhielten die Experimentalkulturen das nach abzentrifugieren gewonnene Medium der verbliebenen 12 "Austauschkulturen". Zu jeweils 2 Parallelkulturen der Experimentalserie wurde Colcemid zu verschiedenen Zeiten von 36 - 62 Std. nach Ansatz hinzugegeben. Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte ebenfalls zu verschiedenen Zeiten von 40 - 72 Std. nach Ansatz (siehe Abbildung 3): Serie A: Colcemid 36 Std., Aufarbeitung 40 Std. nach Ansatz; Serie B: Colcemid 40 Std., Aufarbeitung 44 Std. nach Ansatz; Serie C: Colcemid 44 Std., Aufarbeitung 50 Std. nach Ansatz; Serie D: Colcemid 50 Std., Aufarbeitung 56 Std. nach Ansatz; Serie E: Colcemid 56 Std., Aufarbeitung 62 Std. nach Ansatz; Serie F: Colcemid 62 Std., Aufarbeitung 72 Std. nach Ansatz.

Auf diese Weise wurden in den verschiedenen Parallelserien die nacheinander von 36 - 72 Std. auftretenden Mitosen in einzelnen, aneinandergrenzenden Intervallen angesammelt, die zusammen alle Mitosen umfassen, die in diesem Kultursystem bis zu 72 Std. überhaupt auftreten.

Nach Aufarbeitung der Leukozytenkulturen wurden die Präparate mit Orcein gefärbt und die Häufigkeiten von Chromosomenaberrationen (Dizentrische Chromosomen, Ringchromosomen und Inversionen), sowie zusätzlich die Prozentsätze von Mitosen und die von Interphasekernen mit Mikrokern in den einzelnen Versuchsserien ermittelt. Nach der Auswertung wurden Autoradiographien angefertigt und soweit möglich sämtliche analysierten Mitosen auf Markierung hin erneut untersucht.

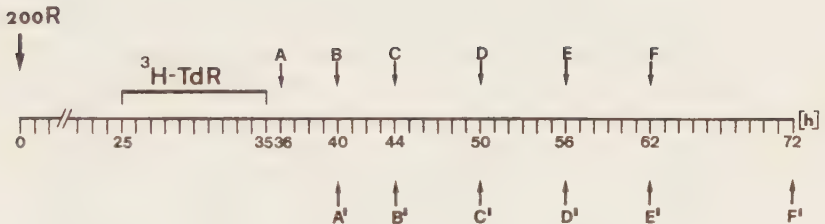


Abbildung 3. Versuchsanordnung im Experiment zur

Untersuchung der Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Bestrahlung von Vollblut im  $G_0$ -Stadium des Zellzyklus mit 200 R. Pulsmarkierung mit  $^3\text{H-TdR}$  25 - 35 Std. nach Kulturansatz. Zugabe von Colcemid zu jeweils zwei Parallelkulturen zu verschiedenen Zeiten nach Kulturansatz (A - F; A = 36, B = 40, C = 44, D = 50, E = 56, F = 62 Std. nach Ansatz). Aufarbeitung der entsprechenden Parallelkulturen ebenfalls zu verschiedenen Zeiten nach Kulturansatz (A' - F'; A' = 40, B' = 44, C' = 50, D' = 56, E' = 62, F' = 72 Std. nach Ansatz)

Wie aus Abbildung 4 und Tabelle 4 ersichtlich, traten zu den Aufarbeitungszeiten 40 Std. (= Serie A) und 44 Std. (= Serie B) noch keine Mitosen auf, während sich die Prozentsätze von Mitosen von 50 Std. (= Serie C) über 56 Std. (= Serie D) und 62 Std. (= Serie E) bis zu 72 Std. (= Serie F) kontinuierlich erhöhen und bei 72 Std. einen Wert von annähernd 7% erreichen. Wegen der Colcemidbehandlung stellen die hier ermittelten Mitosehäufigkeiten keine "echten" Mitoseindices dar, sondern sind ein Maßstab für die Zunahme der Mitosehäufigkeiten in den einzelnen Versuchsserien. Ebenfalls in Abbildung 4 und Tabelle 4 sind die Häufigkeiten von Interphasekernen mit Mikrokern in den einzelnen Versuchsserien angegeben. Auch hier ist eine kontinuierliche Zunahme bis zu ca. 2% bei 72 Std. nach Ansatz festzustellen.

In allen Versuchsserien wurden Dizentrische Chromosomen, Ringchromosomen und Inversionen (siehe Abbildung III, IV, V), gefunden. Alle Dizentrischen Chromosomen und Ringchromosomen waren mit Fragmenten assoziiert. Darüber hinaus wurden Fragmente nicht ausgewertet. Den Dizentrischen Chromosomen kommt das größte Gewicht bei der Beurteilung von Aberrationshäufigkeiten chromosomaler Aberrationen zu, da sie am eindeutigsten zu identifizieren sind. Kleine Ringchromosomen sind, besonders in Seitenansicht, leicht mit Fragmenten zu verwechseln. Inversionen sind ohne Zuhilfenahme besonderer Färbemethoden ("Bandenmuster") nur als auffällige perizentrische Inversionen, bei denen das Zentromer verlagert wurde, erkennbar. In Tabelle 5 sind die Häufigkeiten von Dizentrischen Chromosomen, Ringchromosomen und Inversionen in allen Versuchsserien, in denen ausreichende Anzahlen von Mitosen gefunden wurden (50-, 56-, 62- und 72 Std.-Serie) dargestellt, sowie die Anzahlen ausgewerteter Mitosen. Den bei weitem am häufigsten gefundenen Aberrationstyp stellen die Dizentrischen Chromosomen dar. Danach folgen Ringchromosomen und Inversionen.

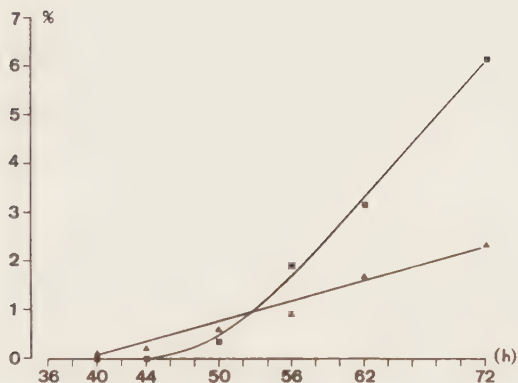


Abbildung 4. Prozentsätze von Mitosen (Quadrate) und von Interphasezellen mit Haupt- und Mikrokern (Dreiecke) zu den einzelnen Aufarbeitungszeiten im Experiment zur Ermittlung der Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Zusammengefaßte Werte zweier Parallelversuche (A und B, siehe Tabelle 4). Versuchsansätze siehe Abbildung 3

Die höchsten Werte von Dizentrischen Chromosomen (ca. 20%) und Ringchromosomen (ca. 5%) finden sich bei Aufarbeitung nach 50 Std. Danach sinken diese Werte zunächst bei 56 Std. auf ca. 15% für Dizentrische Chromosomen und 3% für Ringchromosomen ab, steigen bei 62 Std. erneut leicht an und sinken bei 72 Std. wieder ab. Diese Häufigkeitsverteilung zu den einzelnen Aufarbeitungszeitpunkten gilt auch für die Inversionen, deren Werte jedoch nach 56 Std. kontinuierlich absinken. Die in Tabelle 5 angegebenen Häufigkeiten von Chromosomenmutationen zu den einzelnen Aufarbeitungszeiten liefern das Ausgangsmaterial für die autoradiographische Analyse.

Bis auf wenige Ausnahmen (siehe Tabelle 6 ) wurden alle ausgewerteten Mitosen nach der Autoradiographie wiedergefunden, so daß eine eindeutige Beurteilung der Markierungsverhältnisse vorgenommen werden konnte. Durch den Verlust dieser wenigen Mitosen werden die in Tabelle 5 angegebenen Aberrationshäufigkeiten der einzelnen Versuchsserien nicht verändert und können daher unkorrigiert zum Vergleich mit Aberrationshäufigkeiten in unmarkierten und markierten Mitosen beibehalten werden. Daneben sind in Tabelle 6 die Häufigkeiten markierter und unmarkierter Mitosen in allen Versuchsserien angegeben. Als "markiert" galten hierbei Mitosen mit mehr als 10 Silberkörnern über dem Chromatin. Aus der Gruppe markierter Mitosen ließ sich zusätzlich eine Klasse von Mitosen ausgliedern, deren starke Markierung eine eindeutige Beantwortung der Frage zuließ, ob die vorliegende Mitose das typische Markierungsmuster einer ersten oder späteren Mitose nach Pulsmarkierung (und damit nach Aberrationsinduktion) aufweist. Hierbei zeigte sich, daß bei allen in Frage kommenden Mitosen ein Markierungsmuster vorlag, das der ersten Mitose nach Pulsmarkierung entspricht. Die Häufigkeiten stark markierter

Mitosen zu den einzelnen Aufarbeitungszeitpunkten sind in Tabelle 6 angegeben. Die Prozentsätze unmarkierter, markierter und stark markierter Mitosen sind auf die Anzahlen nach Autoradiographie wiedergefundener Mitosen (= 100%) bezogen.

Nahezu alle beim Aufarbeitungszeitpunkt von 50 Std. (Colcemid 44 - 50 Std.) gefundenen Mitosen (ca. 95%) waren markiert, und damit Zellen der ersten, früh replizierenden Subpopulation (Tabelle 6 , Abbildung 5 ). Die Häufigkeiten markierter Mitosen sinken bis zu 72 Std. (Colcemid 62 - 72 Std.) kontinuierlich auf einen Wert von ca. 40% ab. Bei ca. 69 Std. nach Kulturan-satz sind die Anteile markierter zu unmarkierter Mitosen etwa gleich.

Annähernd 60% der bei 50 Std. gefundenen Mitosen sind stark markierte (erste) Mitosen. Die Prozentsätze der nachweislich ersten Mitosen in diesem Kultursystem sinken etwas rascher ab, als die Prozentsätze markierter Mitosen insgesamt (Tabelle 6 , Abbildung 5 ). Bei 62 Std. (Colcemid 56 - 62 Std.) nach Kulturan-satz sind noch ca. 8% stark markierte (erste) Mitosen vorhanden, bei 72 Std. noch ca. 2%.

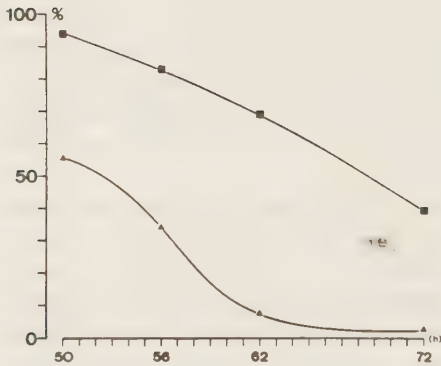


Abbildung 5. Prozentsätze markierter (Quadrate) und stark markierter (1.) Mitosen (Dreiecke) zu den einzelnen Aufarbeitungszeiten im Experiment zur Ermittlung der Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Zusammengefaßte Werte zweier Parallelversuche (A und B, siehe Tabelle 6). Versuchsansätze siehe Abbildung 3

Die Raten Dizentrischer Chromosomen in unmarkierten Mitosen (Tabelle 7 , Abbildung 6 ) liegen zu allen Aufarbeitungszeiten unter den vor Autoradiographie ermittelten Ausgangswerten (Tabelle 5 , Abbildung 6 ). In unmarkierten Mitosen finden sich Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen von 10% in der 50- und 56 Std.-Serie, die bei 62 Std. auf ca. 15% ansteigen und bei 72 Std. wieder auf ca. 11% absinken. Die Dizentrischen Chromosomen stellen auch hier den häufigsten Aberrationstyp dar. Bis auf die 56 Std.-Serie sind Ringchromosomen in ähnlichen Häufigkeiten wie vor Autoradiographie vorhanden. Die geringen Anzahlen unmarkierter Mitosen zu den beiden ersten Aufarbeitungszeiten (50- und 56 Std.-Serie) relativieren die scheinbare Gegenläufigkeit der Häufigkeitsverteilungen Dizentrischer Chromosomen im Ausgangsmaterial und in unmarkierten Mitosen zu den verschiedenen Zeiten (Abbildung 6 ). Die wenigen Inversionen können hier vernachlässigt werden. Ihre Häufigkeiten in den einzelnen Versuchsserien gehen in die unten aufgeführten Gesamtzahlen der Bruchereignisse pro Zelle ein, die eine Zusammenfassung aller Aberrationstypen zu einem Wert, der "Bruchrate" pro Zelle, gestatten (Dizentrische Chromosomen, Ringchromosomen, Inversionen = jeweils 2 Bruchereignisse).

In der Klasse der markierten Mitosen finden sich zu allen Aufarbeitungszeiten deutlich mehr Dizentrische Chromosomen als in unmarkierten Mitosen (Tabelle 8 , Abbildung 6 ); zudem liegen die Raten Dizentrischer Chromosomen in allen Serien in markierten Zellen auch über den vor Autoradiographie ermittelten Werten des Ausgangsmaterials (Tabelle 5 , Abbildung 6 ). Der t-Test für Paardifferenzen zwischen den Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen in markierten und unmarkierten Mitosen aller Versuchsserien ergibt eine statistisch signifikante Differenz ( $t = 3,34$ ; 3 Freiheitsgrade;  $P < 0,05$ ).

Die Häufigkeitsverteilung der Raten Dizentrischer Chromosomen in markierten Mitosen ist bis zu 62 Std. den vor Autoradiographie ermittelten Werten sehr ähnlich, steigt jedoch von 62 bis 72 Std. erneut an. Die Häufigkeitsverteilungen der Ringchromosomen in markierten Mitosen ähneln ebenfalls denen, die vor Autoradiographie ermittelt wurden (Tabelle 8 ).

In der Klasse der stark markierten (ersten) Mitosen sind nur in den 50-, 56- und 62 Std.-Serien ausreichende Mitoseraten zum Vergleich der Aberrationshäufigkeiten vorhanden. Wie aus Tabelle 9 und Abbildung 7 ersichtlich, liegen die Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen in stark markierten (ersten) Mitosen deutlich über den entsprechenden Raten in unmarkierten Mitosen. Die Häufigkeitsverteilung der Ringchromosomen ähnelt wiederum den vor Autoradiographie ermittelten Werten (Tabelle 9 ).

In Tabelle 10 sind die Gesamtzahlen der Bruchereignisse pro Zelle (Bruchrate) in allen Versuchsserien und Beurteilungsklassen als zusammenfassender Wert angegeben. In allen Serien liegen die Bruchraten sowohl in der Klasse der markierten als auch der stark markierten (ersten) Mitosen über den Bruchraten in unmarkierten Mitosen. Die Bruchraten in der Klasse der markierten Mitosen sind außerdem auch in allen Serien höher als die vor Autoradiographie ermittelten Bruchraten des Ausgangsmaterials.

Der hier verwendete Versuchsansatz gestattet eine eindeutige Zuordnung aller ausgewerteter Mitosen zur ersten (= markierte Mitosen) oder zur zweiten (= unmarkierte Mitosen) Subpopulation von Zellen. Darüber hinaus wurden sämtliche bis zu 72 Std. nach Kulturan-

satz auftretende Mitosen nacheinander erfaßt (vergl. Abbildung 4 ). Daher können zum endgültigen Vergleich der Sensitivitäten der beiden Subpopulationen gegenüber Röntgenbestrahlung die Einzelwerte der verschiedenen Aufarbeitungszeiten innerhalb der Beurteilungsklassen zusammengefaßt und miteinander verglichen werden. Besonders sinnvoll erscheint dies in Anbetracht der einander bedingenden alternierenden Häufigkeiten markierter und unmarkierter Mitosen.

In Tabelle 11 ist ein Vergleich der Aberrationshäufigkeiten und Anzahlen der Bruchereignisse pro Zelle vor und nach Autoradiographie dargestellt. Wie aus der Tabelle ersichtlich, liegen die Häufigkeiten aller Chromosomenmutationen in der Klasse der markierten Mitosen über den Werten der Klasse unmarkierter Mitosen. Wie bereits erwähnt kommt hierbei den Raten Dizen-trischer Chromosomen das größte Gewicht zu. Die Differenz der Häufigkeiten Dizen-trischer Chromosomen zwischen markierten und unmarkierten Mitosen ist statistisch signifikant ( $\chi^2 = 14,32$ ; 1 Freiheitsgrad;  $P < 0,001$ ).

Demnach unterscheiden sich die beiden in menschlichen Leukozytenkulturen auftretenden Subpopulationen auch im Hinblick auf die Induktion von Chromosomenmutationen mit Röntgenstrahlen im  $G_0$ -Stadium des Zellzyklus voneinander, wobei die erste Population wiederum sensiti-ver ist als die zweite.

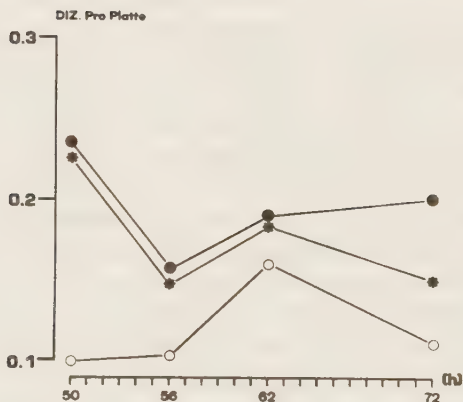


Abbildung 6. Vergleich der Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen pro Platte zu den einzelnen Aufarbeitungszeiten im Experiment zur Ermittlung der Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung im Ausgangsmaterial (Sterne), in markierten (dunkle Punkte) und unmarkierten (helle Punkte) Mitosen. Zusammengefaßte Werte zweier Parallelversuche (A und B, siehe Tabelle 5, 7 und 8). Versuchsansätze siehe Abbildung 3

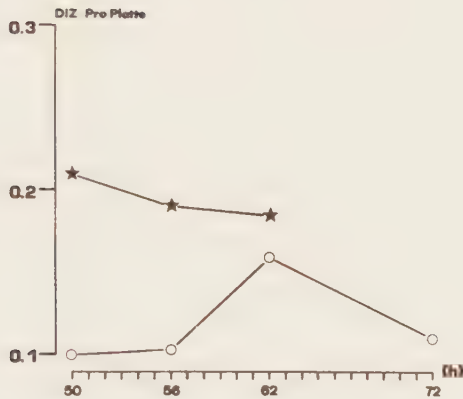


Abbildung 7. Vergleich der Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen pro Platte zu den einzelnen Aufarbeitungszeiten im Experiment zur Ermittlung der Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung in stark markierten (1.) Mitosen (Sterne) und in unmarkierten Mitosen (helle Punkte). Zusammengefaßte Werte zweier Parallelversuche (A und B, siehe Tabelle 7 und 9). Versuchsansätze siehe Abbildung 3

| Serie      | Mitosen (%) | Mikronuklei (%) |
|------------|-------------|-----------------|
| 40 h A     | 0,00        | 0,20            |
| 40 h B     | 0,00        | 0,00            |
| Total 40 h | 0,00        | 0,10            |
| 44 h A     | 0,00        | 0,10            |
| 44 h B     | 0,00        | 0,30            |
| Total 44 h | 0,00        | 0,20            |
| 50 h A     | 0,20        | 0,40            |
| 50 h B     | 0,50        | 0,50            |
| Total 50 h | 0,35        | 0,45            |
| 56 h A     | 2,40        | 0,90            |
| 56 h B     | 1,40        | 0,90            |
| Total 56 h | 1,90        | 0,90            |
| 62 h A     | 3,10        | 1,50            |
| 62 h B     | 3,20        | 1,90            |
| Total 62 h | 3,15        | 1,70            |
| 72 h A     | 6,50        | 1,70            |
| 72 h B     | 5,80        | 3,00            |
| Total 72 h | 6,15        | 2,35            |

Tabelle 4. Prozentsätze von Mitosen und von Interphasekernen mit Mikrokern in den **einzelnen** Parallelserien im Experiment zur Ermittlung der Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Versuchsanordnung siehe Abbildung 3 und Text. Je Parallelserie (A,B) wurden 1000 Zellen ausgewertet

| Serie    | Anzahl<br>Mitosen | Dizentrische Chromosomen |            | Ringchromosomen |       | Inversionen |        |
|----------|-------------------|--------------------------|------------|-----------------|-------|-------------|--------|
|          |                   | Total                    | pro Platte | % Mit.          | Total | pro Platte  | % Mit. |
| 50 h A   | 250               | 62                       | 0,248      | 22,80           | 11    | 0,044       | 4,40   |
| 50 h B   | 88                | 14                       | 0,159      | 13,64           | 6     | 0,068       | 6,82   |
| Total 50 | 338               | 76                       | 0,225      | 20,41           | 17    | 0,050       | 5,03   |
| 56 h A   | 300               | 43                       | 0,143      | 14,00           | 9     | 0,030       | 3,00   |
| 56 h B   | 100               | 16                       | 0,160      | 16,00           | 3     | 0,030       | 3,00   |
| Total 56 | 400               | 59                       | 0,147      | 14,50           | 12    | 0,030       | 3,00   |
| 62 h A   | 400               | 72                       | 0,180      | 17,50           | 19    | 0,047       | 4,75   |
| 62 h B   | 300               | 56                       | 0,187      | 17,67           | 12    | 0,040       | 4,00   |
| Total 62 | 700               | 128                      | 0,183      | 17,57           | 31    | 0,044       | 4,43   |
| 72 h A   | 270               | 40                       | 0,148      | 13,33           | 13    | 0,048       | 4,81   |
| 72 h B   | 30                | 5                        | 0,167      | 16,67           |       |             |        |
| Total 72 | 300               | 45                       | 0,150      | 13,33           | 13    | 0,043       | 4,33   |

Tabelle 5. Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Aberrationshäufigkeiten zu den verschiedenen Aufarbeitungszeiten vor Autoradiographie

| Serie      | Anzahl Mitosen<br>vor Autoradio-<br>graphie |  | Anzahl Mitosen<br>nach Autoradio-<br>graphie |  | Unmarkierte<br>Mitosen |       | Markierte<br>Mitosen |       | Stark markierte<br>(1.) Mitosen |       |
|------------|---------------------------------------------|--|----------------------------------------------|--|------------------------|-------|----------------------|-------|---------------------------------|-------|
|            |                                             |  |                                              |  | Total                  | %     | Total                | %     | Total                           | %     |
| 50 h A     | 250                                         |  | 247                                          |  | 17                     | 6,88  | 230                  | 93,12 | 131                             | 53,04 |
| 50 h B     | 88                                          |  | 88                                           |  | 3                      | 3,41  | 85                   | 96,59 | 55                              | 62,50 |
| Total 50 h | 338                                         |  | 335                                          |  | 20                     | 5,97  | 315                  | 94,03 | 186                             | 55,52 |
| 56 h A     | 300                                         |  | 299                                          |  | 39                     | 13,04 | 260                  | 86,96 | 120                             | 40,13 |
| 56 h B     | 100                                         |  | 100                                          |  | 29                     | 29,00 | 71                   | 71,00 | 16                              | 16,00 |
| Total 56 h | 400                                         |  | 399                                          |  | 68                     | 17,04 | 331                  | 82,96 | 136                             | 34,09 |
| 62 h A     | 400                                         |  | 395                                          |  | 132                    | 33,41 | 263                  | 66,59 | 43                              | 10,89 |
| 62 h B     | 300                                         |  | 300                                          |  | 81                     | 27,00 | 219                  | 73,00 | 11                              | 3,67  |
| Total 62 h | 700                                         |  | 695                                          |  | 213                    | 30,65 | 482                  | 69,35 | 54                              | 7,77  |
| 72 h A     | 270                                         |  | 268                                          |  | 170                    | 63,43 | 98                   | 36,57 | 7                               | 2,61  |
| 72 h B     | 30                                          |  | 30                                           |  | 11                     | 36,67 | 19                   | 63,33 | 0                               | 0,00  |
| Total 72 h | 300                                         |  | 298                                          |  | 181                    | 60,74 | 117                  | 39,26 | 7                               | 2,35  |

Tabelle 6. Anzahlen vor Autoradiographie ausgewerteter und nach Autoradiographie wiedergefundener Mitosen, sowie die Häufigkeiten unmarkierter, markierter und stark markierter (1.) Mitosen in den einzelnen Versuchsserien



| Serie    | Anzahl<br>Mitosen | Dizentrische Chromosomen |            | Ringchromosomen |       | Inversionen |        |
|----------|-------------------|--------------------------|------------|-----------------|-------|-------------|--------|
|          |                   | Total                    | pro Platte | % Mit.          | Total | pro Platte  | % Mit. |
| 50 h A   | 230               | 60                       | 0,261      | 23,91           | 10    | 0,043       | 4,35   |
| 50 h B   | 85                | 14                       | 0,165      | 14,12           | 6     | 0,071       | 7,06   |
| Total 50 | 315               | 74                       | 0,235      | 21,27           | 16    | 0,051       | 5,10   |
| 56 h A   | 260               | 38                       | 0,146      | 14,23           | 9     | 0,035       | 3,46   |
| 56 h B   | 71                | 14                       | 0,197      | 19,72           | 3     | 0,042       | 4,23   |
| Total 56 | 331               | 52                       | 0,157      | 15,41           | 12    | 0,036       | 3,60   |
| 62 h A   | 263               | 45                       | 0,171      | 16,73           | 10    | 0,038       | 3,80   |
| 62 h B   | 219               | 46                       | 0,210      | 20,09           | 11    | 0,050       | 5,02   |
| Total 62 | 482               | 91                       | 0,189      | 18,26           | 21    | 0,044       | 4,36   |
| 72 h A   | 98                | 20                       | 0,204      | 17,35           | 4     | 0,041       | 4,08   |
| 72 h B   | 19                | 3                        | 0,158      | 15,79           |       |             |        |
| Total 72 | 117               | 23                       | 0,200      | 17,09           | 4     | 0,034       | 3,42   |

Tabelle 8. Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Aberrationshäufigkeiten zu den verschiedenen Aufarbeitungszeiten in markierten Mitosen

| Serie    | Anzahl<br>Mitosen | Dizentrische Chromosomen |            | Ringchromosomen |       | Inversionen |        |
|----------|-------------------|--------------------------|------------|-----------------|-------|-------------|--------|
|          |                   | Total                    | pro Platte | % Mit.          | Total | pro Platte  | % Mit. |
| 50 h A   | 131               | 31                       | 0,231      | 21,37           | 5     | 0,038       | 3,82   |
| 50 h B   | 55                | 8                        | 0,145      | 14,55           | 3     | 0,055       | 5,45   |
| Total 50 | 186               | 39                       | 0,210      | 19,35           | 8     | 0,043       | 4,30   |
| 56 h A   | 120               | 25                       | 0,208      | 20,00           | 3     | 0,025       | 2,50   |
| 56 h B   | 16                | 1                        | 0,063      | 6,25            | 1     | 0,063       | 6,25   |
| Total 56 | 136               | 26                       | 0,191      | 18,38           | 4     | 0,029       | 2,94   |
| 62 h A   | 43                | 9                        | 0,209      | 20,93           | 2     | 0,047       | 4,65   |
| 62 h B   | 11                | 1                        | 0,091      | 9,09            |       |             |        |
| Total 62 | 54                | 10                       | 0,185      | 18,52           | 2     | 0,037       | 3,70   |

Tabelle 9. Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Aberrationshäufigkeiten zu den verschiedenen Aufarbeitungszeiten in stark markierten (1.) Mitosen

| Serie | Bruchrate vor<br>Autoradiographie | Bruchrate nach Autoradiographie |                   |                                 |
|-------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|
|       |                                   | Unmarkierte Mitosen             | Markierte Mitosen | Stark markierte<br>(1.) Mitosen |
|       | (Anzahl Mitosen)                  | (Anzahl Mitosen)                | (Anzahl Mitosen)  | (Anzahl Mitosen)                |
| 50 h  | 0,574<br>(338)                    | 0,300<br>(20)                   | 0,590<br>(315)    | 0,527<br>(186)                  |
| 56 h  | 0,380<br>(400)                    | 0,235<br>(68)                   | 0,419<br>(331)    | 0,471<br>(136)                  |
| 62 h  | 0,466<br>(700)                    | 0,413<br>(213)                  | 0,481<br>(482)    | 0,444<br>(54)                   |
| 72 h  | 0,393<br>(300)                    | 0,331<br>(181)                  | 0,462<br>(117)    |                                 |

Tabelle 10. Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Anzahlen der Bruchereignisse pro Platte (Bruchrate): Dizentrisches Chromosom, Ringchromosom, Inversion = 2 Bruchereignisse) vor und nach Autoradiographie zu den verschiedenen Aufarbeitungszeiten

|                                 | Anzahl Mitosen | Dizentrische<br>Chromosomen | Ringchromosomen | Inversionen | Bruchrate |
|---------------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------|-------------|-----------|
| Vor Auto-<br>radiographie       | 1738           | 0,176                       | 0,042           | 0,008       | 0,453     |
| Unmarkierte<br>Mitosen          | 482            | 0,118                       | 0,037           | 0,005       | 0,320     |
| Markierte<br>Mitosen            | 1245           | 0,195                       | 0,041           | 0,008       | 0,488     |
| Stark markierte<br>(1.) Mitosen | 383            | 0,196                       | 0,037           | 0,021       | 0,507     |

Tabelle 11. Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Vergleich der Aberrationshäufigkeiten und Anzahlen der Bruchereignisse pro Platte (Bruchrate: Dizentrisches Chromosom, Ringchromosom, Inversion = 2 Bruchereignisse) vor und nach Autoradiographie (zusammengefaßte Werte aller Aufarbeitungszeiten)



Abbildung III. Metaphaseplatte mit einem Dizentrischen Chromosom (Pfeil) und einem dazugehörigen Fragment (1). In ersten Mitosen nach Aberrationsinduktion treten Dizentrische Chromosomen in der Regel mit einem oder zwei Fragmenten assoziiert auf, die nicht auf zusätzliche Aberrationseignisse zurückzuführen sind, sondern Restelemente des Dizentrischen Chromosoms darstellen. Da die Fragmente entweder als Einzelelemente erhalten bleiben, oder, wie im vorliegenden Fall, miteinander reuniert sein können, sind einem Dizentrischen Chromosom ein oder zwei Fragmente zuzuordnen



Abbildung IV. Metaphaseplatte mit einem zentrischen Ringchromosom (Pfeil) und einem dazugehörigen Fragment (1). In ersten Mitosen nach Aberrationsinduktion treten Ringchromosomen ebenfalls mit einem oder zwei Fragmenten assoziiert auf



Abbildung V. Metaphaseplatte mit einer perizentrischen Inversion (Pfeil), durch die das Zentromer des betroffenen Chromosoms verlagert wurde. Inversionen sind ohne Zuhilfenahme besonderer Färbemethoden (Bandenmuster) hier nur als besonders auffällige perizentrische Inversionen erkennbar

### III. 4) Das RNS-Synthese-Muster der 2-Tage-Kultur

Im folgenden Experiment wurde das RNS-Synthese-Muster von 1 - 53 Std. nach Kulturansatz ("2-Tage-Kultur") autoradiographisch untersucht. In Glasflaschen wurden Leukozytenkulturen der dreifachen Blut- und Mediummenge (dreifache Standard-Kultur) angesetzt und zu verschiedenen Zeiten nach Kulturbeginn von jeweils 2 Parallelkulturen (Serie A und B) je 1 ml mit sterilen Einwegspritzen entnommen. Die Entnahme erfolgte 30 Min. vor Aufarbeitung der entsprechenden Probe; 15 Min. vor Aufarbeitung wurde den 1 ml-Parallelkulturen 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -UR zum Nachweis der RNS-Synthese zugegeben. Zwischen Entnahme der 1 ml-Parallelkulturen und Zugabe des  $^3\text{H}$ -UR, und zwischen Zugabe des  $^3\text{H}$ -UR und Aufarbeitung wurden die Proben im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Nach Aufarbeitung der 1 ml-Parallelkulturen und Färbung der Präparate mit Orcein wurden Autoradiographien angefertigt und die Prozentsätze markierter Interphasekerne zu den verschiedenen Zeiten ermittelt. Als markiert galten hierbei Interphasekerne mit mehr als 10 Silberkörnern über dem Chromatin. In jeder Parallelserie wurden mindestens 500 Interphasekerne, d.h., für jeden Aufarbeitungszeitpunkt mindestens 1000 Zellen analysiert.

Um den für die Aufarbeitungen benötigten Zeitaufwand zu reduzieren, wurde das Experiment in zwei Teile gegliedert und der Ansatz der einzelnen Kulturen zeitlich versetzt. Teil I des Experiments liefert jeweils zwei 1 ml-Parallelkulturen für jede Stunde zwischen 1 - 25 Std. nach Kulturansatz, Teil II jeweils zwei Parallelkulturen von 1 ml für jede Stunde zwischen 26 - 53 Std.

Für Teil I wurden Dreifach-Standardkulturen am 1. Tag um 19.00 und 20.00 Uhr und am 2. Tag um 8.00 und 9.00 Uhr

angesetzt. Am 2. Tag wurden die 1 ml-Parallelkulturen um 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00 und 20.00 Uhr aufgearbeitet. Eine Zuordnung von Kulturansatz, Aufarbeitungszeit und Kulturdauer in Teil I ermöglicht Abbildung 8.

Für Teil II wurden Dreifach-Standard-Kulturen am 1. Tag um 19.00 und 20.00 Uhr und am 2. Tag um 8.00 und 9.00 Uhr angesetzt. Am 3. Tag wurden die 1 ml-Parallelkulturen um 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00, 20.00, 22.00 und 24.00 Uhr aufgearbeitet. Abbildung 9 gestattet die Zuordnung von Kulturansatz, Aufarbeitungszeit und Kulturdauer in Teil II.

Die Ergebnisse der Untersuchung des RNS-Synthesemusters von 1 - 53 Std. nach Kulturansatz in den beiden Parallelserien sind in Tabelle 12 (Serie A), Tabelle 13 (Serie B) und in Abbildung 10 dargestellt. Die Häufigkeitsverteilung der Prozentsätze markierter Interphasekerne in dem genannten Kulturzeitraum gestattet eine zunächst formale Untergliederung in drei Zeiträume unterschiedlicher RNS-Syntheseaktivitäten (siehe Abb. 10):

Im ersten Zeitraum (1 - 13 Std.) ist eine geringe RNS-Syntheserate nachweisbar, die, bis auf zwei Ausnahmen (5 und 6 Std.) in Serie A, langsam bis zu einem Wert von 10% markierten Interphasekernen bei 11 - 13 Std. ansteigt. Trotz anfänglich niedriger Werte ist ein Einbau von  $^3\text{H}$ -UR bereits 1 Std. nach Kulturansatz (und damit nach Stimulierung mit Phytohämagglutinin) eindeutig nachweisbar.

Im zweiten Zeitraum (13 - 23 Std.) finden sich zwei erhebliche Anstiege der RNS-Syntheserate im Bereich von 14 (Serie A) bis 15 (Serie B) Std. und im Bereich von 19 (Serie A) bis 20 (Serie B) Std. auf Prozentsätze markierter Interphasekerne zwischen 40 und 60%, die durch einen Abfall der Werte auf ca. 10% in beiden Parallelserien

deutlich voneinander getrennt sind. Bei 23 Std. sind die Prozentsätze in beiden Parallelserien auf einen Wert von ca. 5% abgesunken. Demnach sind innerhalb von 13 - 23 Std. nach Kulturansatz zwei deutliche RNS-Synthesemaxima nachweisbar. Die Ergebnisse der beiden Parallelserien stimmen gut überein. In der Parallelserie B treten die Maxima 1 Std. später (15 und 20 Std.) auf als in Serie A (14 und 19 Std.). Während das erste RNS-Synthesemaximum innerhalb eines Zeitraumes von 3 Std., zwischen 13 und 16 Std., auftritt, umfaßt das zweite Maximum einen Zeitraum von 7 Std. (16 - 23 Std.).

Im dritten Zeitraum, von 23 - 53 Std., ist ein unregelmäßiger aber kontinuierlicher Anstieg der Häufigkeiten  $^3\text{H}$ -UR-markierter Interphasekerne festzustellen. Nach 31 Std. Kulturdauer sinken die Werte zu keinem Zeitpunkt mehr unter 40%. Die höchsten Prozentsätze markierter Zellen in der Gesamtserie werden im dritten Zeitraum bei 48 Std. in Serie A (= ca. 74%) und bei 49 Std. in Serie B (= ca. 76%) erreicht. Die Kontinuität des Anstiegs der Prozentsätze markierter Interphasekerne von 23 - 53 Std. wird jedoch durch zwei auffällige Anstiege der RNS-Syntheserate in beiden Parallelserien zwischen 32 und 36 Std. und zwischen 40 und 44 Std. nach Kulturansatz unterbrochen. Innerhalb dieser beiden Zeiträume finden sich die Maxima der Werte in beiden Parallelserien bei 34 Std. (erster Anstieg) und bei 42 Std. (zweiter Anstieg). Die vorliegenden Übereinstimmungen der Ergebnisse beider Parallelserien lassen vermuten, daß die beiden erwähnten Anstiege nicht lediglich Schwankungen im Rahmen eines allgemeinen Sättigungsanstieges darstellen, sondern eine erhöhte Aktivität der RNS-Synthese bei 34 und 42 Std. nach Kulturansatz anzeigen.

In Tabelle 14 und Abbildung 11 sind die gemittelten Werte beider Parallelserien von 1- 53 Std. angegeben. In Abbildung 11 ist eine interpretierende Ausgleichskurve darge-

stellt, die auf den gemittelten Werten beider Parallelserien beruht. Insgesamt läßt sich demnach im Kulturzeitraum von 1 - 53 Std. ein Anstieg der RNS-Syntheserate von ca. 1,5% zu Beginn bis zu über 70% gegen Ende der 2-Tage-Kultur nachweisen. Der ansonsten kontinuierlich erscheinende Anstieg wird durch vier Bereiche deutlich erhöhter RNS-Syntheseaktivität unterbrochen. Innerhalb dieser vier Bereiche liegen die Maxima der Prozentsätze  $^3\text{H}$ -UR-markierter Interphasekerne bei 14, 19, 34 und 42 Std. nach Kulturbeginn.

| 1. TAG         | 2. TAG         |         |         |         |         |         |         |  |  |  |  |
|----------------|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|--|--|--|
| <u>Ansatz:</u> |                |         |         |         |         |         |         |  |  |  |  |
| 19.00          | 13 Std.        | 15 Std. | 17 Std. | 19 Std. | 21 Std. | 23 Std. | 25 Std. |  |  |  |  |
| 20.00          | 12 Std.        | 14 Std. | 16 Std. | 18 Std. | 20 Std. | 22 Std. | 24 Std. |  |  |  |  |
|                | 8.00           | 10.00   | 12.00   | 14.00   | 16.00   | 18.00   | 20.00   |  |  |  |  |
|                | <u>Ansatz:</u> |         |         |         |         |         |         |  |  |  |  |
|                | 8.00           | 2 Std.  | 4 Std.  | 6 Std.  | 8 Std.  | 10 Std. | -----   |  |  |  |  |
|                | 9.00           | 1 Std.  | 3 Std.  | 5 Std.  | 7 Std.  | 9 Std.  | 11 Std. |  |  |  |  |

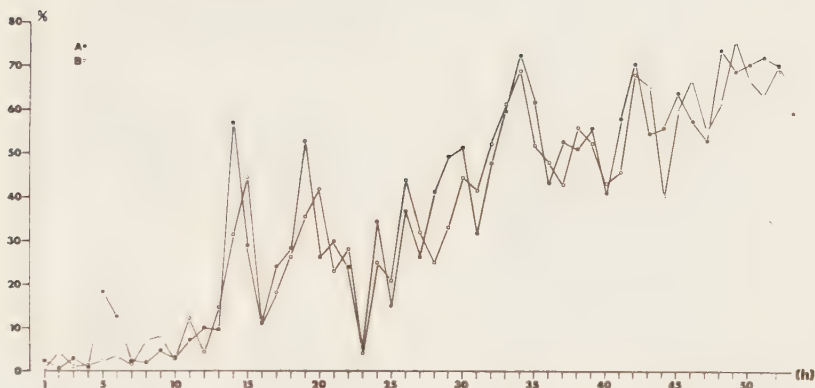
Abbildung 8. Versuchsaufbau im Experiment zur Ermittlung des RNS-Synthese-Musters der 2-Tage-Kultur.

Teil I: Erfassung des Kulturzeitraumes von 1 - 25 Std. Ansatz der Kulturen am 1. Tag des Experimentes um 19.00 und 20.00 Uhr, sowie am 2. Tag um 8.00 und 9.00 Uhr. Aufarbeitungen am 2. Tag des Experimentes um 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00 und 20.00 Uhr. Die Kulturdauer der jeweils aufgearbeiteten 1 ml-Parallelkulturen ist über bzw. unter den in der Mitte der Abbildung von links nach rechts dargestellten Aufarbeitungszeiten in derselben Zeile wie die entsprechenden Ansatzzeiten angegeben

| 1. TAG         | 2. TAG         | 3. TAG                                                                  |
|----------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <u>Ansatz:</u> |                |                                                                         |
| 19.00          |                | 37 Std. 39 Std. 41 Std. 43 Std. 45 Std. 47 Std. 49 Std. 51 Std. 53 Std. |
| 20.00          |                | ----- 38 Std. 40 Std. 42 Std. 44 Std. 46 Std. 48 Std. 50 Std. 52 Std.   |
|                |                | 8.00 - 10.00 - 12.00 - 14.00 - 16.00 - 18.00 - 20.00 - 22.00 - 24.00    |
|                | <u>Ansatz:</u> |                                                                         |
|                | 8.00           | ----- 26 Std. 28 Std. 30 Std. 32 Std. 34 Std. 36 Std. -----             |
|                | 9.00           | ----- 27 Std. 29 Std. 31 Std. 33 Std. 35 Std. -----                     |

Abbildung 9. Versuchsaufbau im Experiment zur Ermittlung des RNS-Synthese-Musters der 2-Tage-Kultur.

Teil II: Erfassung des Kulturzeitraumes von 26 - 53 Std. Ansatz der Kulturen am 1. Tag des Experimentes um 19.00 und 20.00 Uhr, sowie am 2. Tag um 8.00 und 9.00 Uhr. Aufarbeitungen am 3. Tag des Experimentes um 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00, 20.00, 22.00 und 24.00 Uhr. Die Kulturdauer der jeweils aufgearbeiteten 1 ml-Parallelkultur ist über bzw. unter den in der Mitte der Abbildung von links nach rechts dargestellten Aufarbeitungszeiten in derselben Zeile wie die entsprechenden Ansatzzeiten angegeben



**Abbildung 10.** Das RNS-Synthesemuster der 2-Tage-Kultur. Prozentsätze  $^3\text{H}$ -UR markierter Interphasekerne im Kulturzeitraum von 1 - 53 Std. nach Ansatz. A (dunkle Punkte), B (helle Punkte): Parallelserien

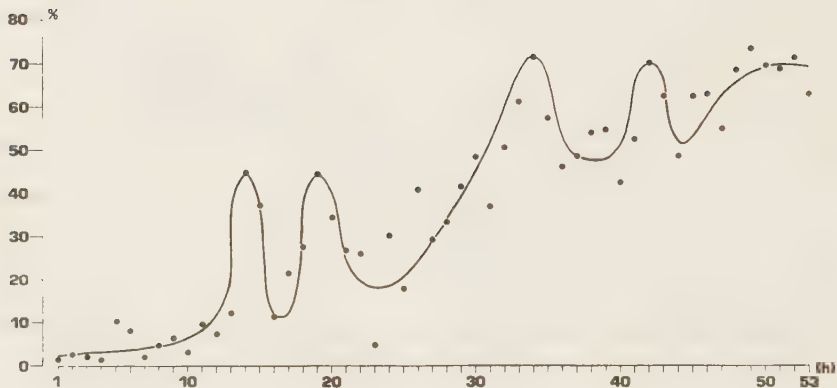


Abbildung 11. Das RNS-Synthesemuster der 2-Tage-Kultur. Gemittelte Prozentsätze  $^3\text{H}$ -UR markierter Interphasekerne beider Parallelserien im Kulturzeitraum von 1 - 53 Std. nach Ansatz mit interpretierender Ausgleichskurve. Der kontinuierlich erscheinende Anstieg der Häufigkeiten markierter Zellen wird durch vier Bereiche deutlich erhöhter RNS-Syntheseaktivität unterbrochen (Maxima bei 14, 19, 34 und 42 Std. nach Kulturbeginn)

Tabelle 12. RNS-Synthese in Leukozytenkulturen von  
1 - 53 Std. nach Kulturansatz. Anzahlen ausge-  
werteter Zellen, Prozentsätze  $^3\text{H}$ -UR markierter  
Interphasekerne und mittlerer Fehler der Pro-  
zentsätze (m). Serie A

| Zeit (h) | Anzahl ausge-<br>werteter Zellen | % markierte<br>Interphasen | m    |
|----------|----------------------------------|----------------------------|------|
| 1        | 505                              | 2,57                       | 0,70 |
| 2        | 500                              | 0,80                       | 0,40 |
| 3        | 501                              | 2,99                       | 0,76 |
| 4        | 502                              | 0,99                       | 0,44 |
| 5        | 500                              | 18,40                      | 1,73 |
| 6        | 500                              | 12,60                      | 1,48 |
| 7        | 503                              | 2,38                       | 0,69 |
| 8        | 500                              | 2,20                       | 0,66 |
| 9        | 501                              | 4,80                       | 0,96 |
| 10       | 500                              | 3,20                       | 0,79 |
| 11       | 500                              | 7,20                       | 1,16 |
| 12       | 500                              | 10,00                      | 1,34 |
| 13       | 500                              | 9,80                       | 1,33 |
| 14       | 500                              | 57,20                      | 2,21 |
| 15       | 500                              | 29,00                      | 2,03 |

Fortsetzung Tabelle 12. Serie A

| Zeit (h) | Anzahl ausge-<br>werteter Zellen | % markierter<br>Interphasen | m    |
|----------|----------------------------------|-----------------------------|------|
| 16       | 500                              | 11,20                       | 1,42 |
| 17       | 505                              | 24,00                       | 1,90 |
| 18       | 500                              | 28,40                       | 2,02 |
| 19       | 500                              | 53,00                       | 2,23 |
| 20       | 506                              | 26,20                       | 1,95 |
| 21       | 532                              | 30,07                       | 1,99 |
| 22       | 508                              | 24,01                       | 1,90 |
| 23       | 500                              | 5,60                        | 1,03 |
| 24       | 500                              | 34,60                       | 2,13 |
| 25       | 513                              | 15,00                       | 1,58 |
| 26       | 500                              | 36,80                       | 2,16 |
| 27       | 500                              | 26,20                       | 1,97 |
| 28       | 500                              | 41,60                       | 2,20 |
| 29       | 520                              | 49,62                       | 2,19 |
| 30       | 500                              | 51,60                       | 2,23 |
| 31       | 500                              | 31,80                       | 2,08 |
| 32       | 500                              | 48,00                       | 2,23 |
| 33       | 500                              | 60,00                       | 2,19 |
| 34       | 500                              | 72,80                       | 1,99 |
| 35       | 500                              | 62,00                       | 2,17 |

Fortsetzung Tabelle 12, Serie A

| Zeit (h) | Anzahl ausge-<br>werteter Zellen | % markierter<br>Interphasen | m    |
|----------|----------------------------------|-----------------------------|------|
| 36       | 500                              | 43,60                       | 2,22 |
| 37       | 500                              | 53,00                       | 2,23 |
| 38       | 500                              | 51,40                       | 2,24 |
| 39       | 500                              | 56,00                       | 2,22 |
| 40       | 500                              | 41,00                       | 2,20 |
| 41       | 500                              | 58,20                       | 2,21 |
| 42       | 500                              | 70,80                       | 2,03 |
| 43       | 500                              | 54,80                       | 2,23 |
| 44       | 500                              | 55,80                       | 2,22 |
| 45       | 500                              | 64,00                       | 2,15 |
| 46       | 500                              | 57,60                       | 2,21 |
| 47       | 500                              | 53,20                       | 2,23 |
| 48       | 500                              | 73,80                       | 1,97 |
| 49       | 500                              | 69,00                       | 2,07 |
| 50       | 500                              | 70,60                       | 2,04 |
| 51       | 500                              | 72,40                       | 2,00 |
| 52       | 500                              | 70,60                       | 2,04 |
| 53       | 500                              | 59,40                       | 2,20 |

Tabelle 13. RNS-Synthese in Leukozytenkulturen von  
1 - 53 Std. nach Kulturansatz. Anzahlen ausge-  
werteter Zellen, Prozentsätze  $^3\text{H}$ -UR markierter  
Interphasekerne und mittlerer Fehler der Pro-  
zentsätze (m). Serie B

| Zeit (h) | Anzahl ausge-<br>werteter Zellen | % markierte<br>Interphasen | m    |
|----------|----------------------------------|----------------------------|------|
| 1        | 521                              | 0,38                       | 0,27 |
| 2        | 500                              | 4,40                       | 0,92 |
| 3        | 547                              | 1,10                       | 0,45 |
| 4        | 500                              | 1,20                       | 0,49 |
| 5        | 500                              | 2,40                       | 0,68 |
| 6        | 500                              | 3,60                       | 0,83 |
| 7        | 518                              | 1,54                       | 0,54 |
| 8        | 500                              | 7,20                       | 1,16 |
| 9        | 500                              | 8,00                       | 1,21 |
| 10       | 500                              | 3,00                       | 0,76 |
| 11       | 500                              | 12,40                      | 1,47 |
| 12       | 500                              | 4,40                       | 0,92 |
| 13       | 500                              | 14,80                      | 1,59 |
| 14       | 500                              | 31,46                      | 2,08 |
| 15       | 502                              | 44,80                      | 2,22 |

Fortsetzung Tabelle 13. Serie B

| Zeit (h) | Anzahl ausge-<br>werteter Zellen | % markierte<br>Interphasen | m    |
|----------|----------------------------------|----------------------------|------|
| 16       | 500                              | 11,00                      | 1,40 |
| 17       | 500                              | 18,20                      | 1,73 |
| 18       | 500                              | 26,40                      | 1,97 |
| 19       | 500                              | 35,60                      | 2,14 |
| 20       | 500                              | 42,00                      | 2,21 |
| 21       | 500                              | 23,00                      | 1,88 |
| 22       | 500                              | 27,80                      | 2,00 |
| 23       | 500                              | 3,80                       | 0,86 |
| 24       | 500                              | 25,00                      | 1,94 |
| 25       | 500                              | 20,80                      | 1,82 |
| 26       | 500                              | 44,20                      | 2,22 |
| 27       | 500                              | 32,00                      | 2,09 |
| 28       | 500                              | 25,00                      | 1,94 |
| 29       | 500                              | 33,20                      | 2,11 |
| 30       | 500                              | 44,80                      | 2,22 |
| 31       | 500                              | 41,80                      | 2,21 |
| 32       | 500                              | 52,40                      | 2,23 |
| 33       | 500                              | 61,60                      | 2,18 |
| 34       | 500                              | 69,20                      | 2,06 |
| 35       | 520                              | 52,11                      | 2,19 |

Fortsetzung Tabelle 13. Serie B

| Zeit (h) | Anzahl ausge-<br>werteter Zellen | % markierte<br>Interphasen | m    |
|----------|----------------------------------|----------------------------|------|
| 36       | 500                              | 48,20                      | 2,23 |
| 37       | 500                              | 43,00                      | 2,21 |
| 38       | 500                              | 56,20                      | 2,22 |
| 39       | 500                              | 52,60                      | 2,23 |
| 40       | 500                              | 43,20                      | 2,22 |
| 41       | 500                              | 45,80                      | 2,23 |
| 42       | 500                              | 68,40                      | 2,08 |
| 43       | 500                              | 65,60                      | 2,12 |
| 44       | 700                              | 40,43                      | 1,85 |
| 45       | 500                              | 60,00                      | 2,19 |
| 46       | 520                              | 67,40                      | 2,06 |
| 47       | 500                              | 55,40                      | 2,22 |
| 48       | 500                              | 61,80                      | 2,17 |
| 49       | 505                              | 76,40                      | 1,89 |
| 50       | 500                              | 67,20                      | 2,10 |
| 51       | 500                              | 63,40                      | 2,15 |
| 52       | 509                              | 70,40                      | 2,02 |
| 53       | 500                              | 65,00                      | 2,13 |

Tabelle 14. RNS-Synthese in Leukozytenkulturen von  
 1 - 53 Std. nach Kulturansatz. Anzahlen ausge-  
 werteter Zellen, Prozentsätze  $^3\text{H}$ -UR markierter  
 Interphasekerne und mittlerer Fehler der Pro-  
 zentsätze (m). Serie A + Serie B ( $\bar{x}$ )

| Zeit (h) | Anzahl ausge-<br>werteter Zellen | % markierte<br>Interphasen | m    |
|----------|----------------------------------|----------------------------|------|
| 1        | 1026                             | 1,48                       | 0,38 |
| 2        | 1000                             | 2,60                       | 0,50 |
| 3        | 1048                             | 2,05                       | 0,44 |
| 4        | 1002                             | 1,10                       | 0,33 |
| 5        | 1000                             | 10,40                      | 0,97 |
| 6        | 1000                             | 8,10                       | 0,86 |
| 7        | 1021                             | 1,96                       | 0,43 |
| 8        | 1000                             | 4,70                       | 0,67 |
| 9        | 1001                             | 6,40                       | 0,77 |
| 10       | 1000                             | 3,10                       | 0,55 |
| 11       | 1000                             | 9,80                       | 0,94 |
| 12       | 1000                             | 7,20                       | 0,82 |
| 13       | 1000                             | 12,30                      | 1,04 |
| 14       | 1000                             | 44,33                      | 1,57 |
| 15       | 1002                             | 36,90                      | 1,52 |

Fortsetzung Tabelle 14. Serie A + Serie B ( $\bar{x}$ )

| Zeit (h) | Anzahl ausge-<br>werteter Zellen | % markierte<br>Interphasen | m    |
|----------|----------------------------------|----------------------------|------|
| 16       | 1000                             | 11,20                      | 1,00 |
| 17       | 1005                             | 21,10                      | 1,29 |
| 18       | 1000                             | 27,40                      | 1,41 |
| 19       | 1000                             | 44,30                      | 1,57 |
| 20       | 1006                             | 34,10                      | 1,50 |
| 21       | 1032                             | 26,53                      | 1,37 |
| 22       | 1008                             | 25,91                      | 1,38 |
| 23       | 1000                             | 4,70                       | 0,67 |
| 24       | 1000                             | 29,80                      | 1,45 |
| 25       | 1013                             | 17,90                      | 1,20 |
| 26       | 1000                             | 40,50                      | 1,55 |
| 27       | 1000                             | 29,10                      | 1,44 |
| 28       | 1000                             | 33,30                      | 1,49 |
| 29       | 1020                             | 41,41                      | 1,54 |
| 30       | 1000                             | 48,20                      | 1,58 |
| 31       | 1000                             | 36,80                      | 1,53 |
| 32       | 1000                             | 50,20                      | 1,58 |
| 33       | 1000                             | 60,80                      | 1,54 |
| 34       | 1000                             | 71,00                      | 1,43 |
| 35       | 1020                             | 57,06                      | 1,55 |

Fortsetzung Tabelle 14. Serie A + Serie B ( $\bar{x}$ )

| Zeit (h) | Anzahl ausge-<br>werteter Zellen | % markierte<br>Interphasen | m    |
|----------|----------------------------------|----------------------------|------|
| 36       | 1000                             | 45,90                      | 1,58 |
| 37       | 1000                             | 48,00                      | 1,58 |
| 38       | 1000                             | 53,80                      | 1,58 |
| 39       | 1000                             | 54,30                      | 1,58 |
| 40       | 1000                             | 42,10                      | 1,56 |
| 41       | 1000                             | 52,00                      | 1,58 |
| 42       | 1000                             | 69,60                      | 1,45 |
| 43       | 1000                             | 60,20                      | 1,55 |
| 44       | 1200                             | 48,12                      | 1,44 |
| 45       | 1000                             | 62,00                      | 1,53 |
| 46       | 1020                             | 62,50                      | 1,52 |
| 47       | 1000                             | 54,30                      | 1,58 |
| 48       | 1000                             | 67,80                      | 1,48 |
| 49       | 1005                             | 72,70                      | 1,41 |
| 50       | 1000                             | 68,90                      | 1,46 |
| 51       | 1000                             | 67,90                      | 1,48 |
| 52       | 1009                             | 70,50                      | 1,44 |
| 53       | 1000                             | 62,20                      | 1,53 |

### III. 5) Strahlensensitivität und Aberrationsspektrum verschiedener Zellzyklusstadien

Die Kenntnis einiger wichtiger Zellzyklusparameter transformierter Leukozyten in diesem Kultursystem ermöglicht eine definierte Mutagenbehandlung verschiedener Zellzyklusstadien, und darüber hinaus verschiedener Zeitabschnitte innerhalb einzelner Stadien menschlicher Leukozyten in vitro. Hierbei kann im Hinblick auf die Induktion von Chromosomenmutationen einmal Information über mögliche Sensitivitätsdifferenzen verschiedener Zellzyklusstadien, zum anderen das für jeden Behandlungszeitpunkt charakteristische Spektrum verschiedener Aberrationstypen erhalten werden. Bei Verwendung von Röntgenstrahlen als Mutagen ist, entsprechend der Replikation der Chromosomen, eine qualitative Veränderung der Aberrationstypen mit fortschreitendem Zellzyklus zu erwarten (chromosomale Aberrationen  $\longrightarrow$  chromatidale Aberrationen).

Bei einer derartigen Untersuchung unter Verwendung dieses Testsystems sollte durch den Versuchsaufbau gewährleistet sein, daß (1) ausschließlich erste Mitosen nach Aberrationsinduktion und (2) nur Mitosen einer der beiden unterschiedlich sensitiven Subpopulationen ausgewertet werden (vergl. Kapitel III. 2 und III. 3). Bei Verwendung von Ham's F-10 Kulturmedium kann dies durch eine Festlegung des Aufarbeitungszeitpunktes bis zu maximal 46 Std. nach Kulturansatz erreicht werden. Bis zu diesem Zeitpunkt sind in diesem Kultursystem lediglich erste Mitosen der ersten Subpopulation von Zellen zu erwarten (DUDIN et al., 1974).

Für dieses Experiment wurden Standard-Leukozytenkulturen in Einwegspritzen angesetzt und bis zu 45 Std. nach

Ansatz kultiviert. Die Zugabe von Colcemid erfolgte 35 Std. nach Ansatz. Jeweils 2 Parallelkulturen (A und B) wurden, mit Ausnahme unbehandelter Kontrollen (Serie K), mit einer Dosis von 200 R Röntgenstrahlen bestrahlt. Außerhalb des Brutschrankes wurden die Kulturen in einem Thermosgefäß bei 37°C aufbewahrt. Alle Bestrahlungen erfolgten bei Zimmertemperatur (ca. 23°C).

Serie G<sub>0</sub>: Bestrahlung in Kulturmedium ohne PHA, das unmittelbar danach zugegeben wurde. Serie 7, 12, 14, 16, 19, 21, 25, 29, 31, 33 und 35: Bestrahlung nach 7 Std., 12 Std., 14 Std., 16 Std., 19 Std., 21 Std., 25 Std., 29 Std., 31 Std., 33 Std. und 35 Std. nach Kulturansatz.

Nach Aufarbeitung der Kulturen wurden Giemsa-gefärbte Präparate aller Serien auf chromosomale (Dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen; siehe Abbildung VIII und IX) und chromatidale Aberrationen (Achromatische Läsionen: AL, Chromatidenbrüche: B', Chromatidentranslokationen: RB'; siehe Abbildung VI und VII) ausgewertet. Isochromatidenbrüche (B'' = 2 Bruchereignisse, Induktion nach Replikation) sind von Fragmenten (Chromosomenbrüche = 1 Bruchereignis, Induktion vor Replikation) anhand morphologischer Kriterien nicht zu unterscheiden. Diese Aberrationen wurden dennoch (als Klasse "B''/Fragmente") in solchen Metaphasen ausgewertet, die keine Dizentrischen Chromosomen oder Ringchromosomen enthielten. Dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen sind in der Regel in ersten Mitosen nach Aberrationsinduktion mit einem oder zwei Fragmenten assoziiert, die nicht auf zusätzliche Aberrationsereignisse zurückzuführen sind (siehe Abbildung VIII und IX). Auf die Auswertung der nur sehr ungenau erfassbaren Inversionen wurde in diesem Experiment verzichtet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 15 und 16, sowie in Abbildung 12 und 13 dargestellt. In Tabelle 15 sind die Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen und Ringchromosomen in unbehandelten Kontrollen, nach Bestrahlung im  $G_0$ -Stadium des Zellzyklus, sowie zu den verschiedenen anderen Zeiten nach Kulturansatz angegeben. Diese Tabelle enthält ebenfalls die Anzahlen in jeder Serie ausgewerteter Metaphasen. In den unbehandelten Kontrollen wurden weder Dizentrische Chromosomen noch Ringchromosomen gefunden. Dasselbe gilt für die Serie 35. In Serie 31 traten Dizentrische Chromosomen, aber keine Ringchromosomen auf. In allen anderen Serien ( $G_0$ , 7, 12, 14, 16, 19, 21, 25, 29 und 33) wurden sowohl Dizentrische Chromosomen als auch Ringchromosomen gefunden, wobei Dizentrische Chromosomen stets häufiger waren als Ringchromosomen. Die Ergebnisse der beiden Parallelversuche sind, besonders im Hinblick auf die Dizentrischen Chromosomen, in allen Serien sehr ähnlich.

Wie aus Tabelle 15 und Abbildung 12 ersichtlich, liegen die Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen nach Bestrahlung nach 7, 12, 14 und 16 Std. nach Ansatz deutlich über den Werten, die nach Bestrahlung im  $G_0$ -Stadium des Zellzyklus erhalten wurden. Die Werte Dizentrischer Chromosomen pro ausgewerteter Metaphaseplatte steigen zunächst von Serie  $G_0$  (0,240) bis Serie 7 (0,440) auf fast das Doppelte an, sinken danach in Serie 12 auf einen Wert von 0,360 ab und steigen in Serie 14 (0,530) und 16 (0,540) erneut an. Die Differenzen in den Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen zwischen Serie 14 und Serie  $G_0$ , sowie zwischen Serie 16 und Serie  $G_0$  sind statistisch signifikant ( $\chi^2$ -Test,  $P < 0,001$ ). In Serie 19 liegen die Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen pro ausgewerteter Metaphaseplatte im Bereich der  $G_0$ -Serie

(0,244), steigen danach in Serie 21 (0,310) erneut leicht an, und sinken in den Serien 25 (0,128), 29 (0,100) und 31 (0,020) stark ab. Wie bereits erwähnt, wurden in Serie 35 überhaupt keine Dizentrischen Chromosomen mehr gefunden. Demnach steigen die Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen nach Bestrahlung zu verschiedenen Zeiten nach Kulturansatz von 0 bis 35 Std. im Bereich von 0 - 16 Std. zunächst auf mehr als das Doppelte an, und sinken im Bereich von 19 - 35 Std. auf Null ab.

Die Häufigkeitsverteilungen von Ringchromosomen in den einzelnen Versuchsserien zeigen tendenzmäßig ein ähnliches Bild, wie es für Dizentrische Chromosomen beschrieben wurde (Tabelle 15, Abbildung 12). Auch hier steigen die pro Metaphaseplatte erhaltenen Werte im Bereich von 0 ( $G_0$ : 0,065) - 14 Std. (0,135) auf den ungefähr doppelten Betrag an. Das Maximum an Ringchromosomen wird nach Bestrahlung zu einem Zeitpunkt von 14 Std. nach Kulturansatz erhalten. Die generell geringeren Häufigkeiten von Ringchromosomen gestatten hier jedoch keine so eindeutige Aussage, wie im Falle der Dizentrischen Chromosomen. Im Bereich von 19 - 35 Std. sinken die Häufigkeiten von Ringchromosomen auf Null ab.

Im Rahmen der angegebenen Versuchsbedingungen steigen demnach die Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen zunächst mit fortschreitender Kulturdauer auf etwa das Doppelte an, wobei maximale Werte nach Bestrahlung in einem Zeitraum von 14 - 16 Std. nach Kulturansatz gefunden werden. Nach diesem Zeitraum sinken die Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen relativ kontinuierlich ab, bis schließlich nach Bestrahlung nach 35-stündiger Kulturdauer überhaupt keine chromosomalen Aberrationen mehr gefunden werden.

Die Häufigkeiten chromatidaler Aberrationen (AL, B', RB', "B''/Fragmente") in unbehandelten Kontrollen, nach Bestrahlung in G<sub>0</sub>, sowie zu den verschiedenen anderen Zeiten nach Kulturansatz sind in Tabelle 16 angegeben. Sowohl in der Kontrolle, als auch in allen Versuchsserien wurden Achromatische Läsionen, Chromatidenbrüche und Isochromatidenbrüche/Fragmente gefunden. Chromatidentranslokationen traten nur in den Serien 12, 16, 19, 29, 31 und 33 auf. Die Häufigkeiten Achromatischer Läsionen liegen in allen bestrahlten Versuchsserien im Bereich des in unbehandelten Kontrollen ermittelten Wertes von 0,050 pro Metaphaseplatte (Tabelle 16). Lediglich in Serie 14 ist eine Erhöhung der Raten Achromatischer Läsionen (0,130 pro Metaphaseplatte) gegenüber dem Kontrollniveau erkennbar. Die Raten der Chromatidenbrüche sind in allen Versuchsserien gegenüber der Kontrolle erhöht (Tabelle 16), schwanken unregelmäßig und übersteigen in keinem Fall einen Wert von 0,100 pro Metaphaseplatte (Abbildung 13). Die höchsten Raten von Chromatidenbrüchen pro Metaphaseplatte werden in Serie 25 (0,085) und Serie 35 (0,100) erreicht. Die Raten der Isochromatidenbrüche/Fragmente liegen in allen bestrahlten Serien ebenfalls über dem Kontrollniveau (Tabelle 16) und schwanken unregelmäßig um einen Wert von ca. 0,100 pro Metaphaseplatte (Abbildung 13). Chromatidentranslokationen wurden nur in einigen Versuchsserien in sehr geringen Häufigkeiten gefunden: Serie 12 (0,010 pro Metaphaseplatte), Serie 16 (0,015 pro Metaphaseplatte), Serie 19 (0,006 pro Metaphaseplatte), Serie 29 (0,010 pro Metaphaseplatte), Serie 31 (0,010 pro Metaphaseplatte) und Serie 33 (0,005 pro Metaphaseplatte).

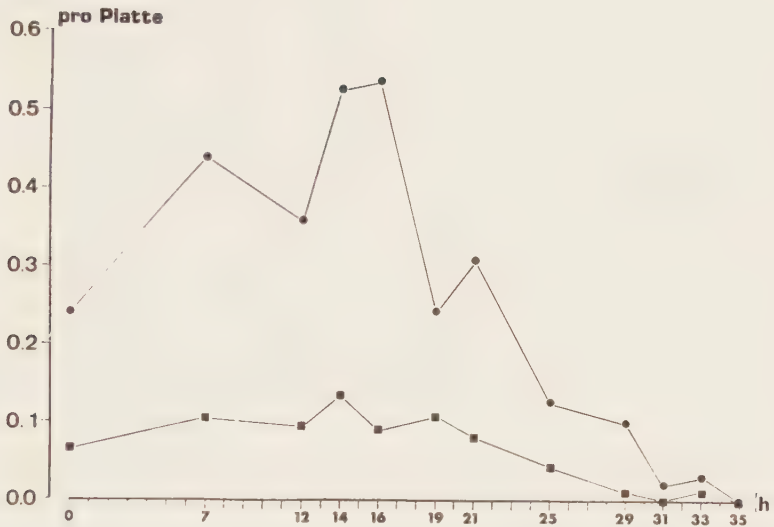


Abbildung 12. Häufigkeiten pro Platte chromosomaler Aberrationen (Dizentrische Chromosomen: Punkte, Ringchromosomen: Quadrate) nach Bestrahlung mit 200 R Röntgenstrahlen im  $G_0$ -Stadium des Zellzyklus (0), sowie nach 7, 12, 14, 16, 19, 21, 25, 29, 31, 33 und 35 Std. nach Kulturansatz. Zugabe von Colcemid nach 35 Std. und Aufarbeitung 45 Std. nach Ansatz in allen Serien

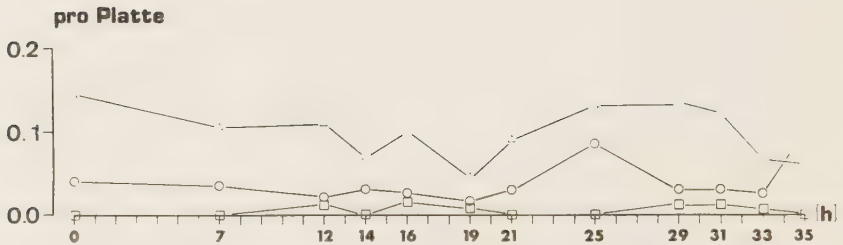


Abbildung 13. Häufigkeiten pro Platte chromatidaler Aberrationen (Chromatidentranslokationen: Quadrate, Chromatidenbrüche: Kreise, Isochromatidenbrüche / Fragmente: Dreiecke) nach Bestrahlung mit 200 R Röntgenstrahlen im  $G_0$ -Stadium des Zellzyklus (0), sowie nach 7, 12, 14, 16, 19, 21, 25, 29, 31, 33 und 35 Std. nach Kulturansatz. Zugabe von Colcemid nach 35 Std. und Aufarbeitung 45 Std. nach Ansatz in allen Serien





Tabelle 15. Fortsetzung II

| Serie  | Anzahl<br>Metaphasen | Dizentrische Chromosomen |            | Ringchromosomen |            |
|--------|----------------------|--------------------------|------------|-----------------|------------|
|        |                      | Total                    | pro Platte | Total           | pro Platte |
|        |                      | % Metaphasen             |            | % Metaphasen    |            |
| 29 A   | 50                   | 5                        | 0,100      | 8,00            |            |
| 29 B   | 50                   | 5                        | 0,100      | 10,00           | 2,00       |
| 29 A+B | 100                  | 10                       | 0,100      | 9,00            | 1,00       |
| 31 A   | 100                  | 2                        | 0,020      | 2,00            |            |
| 31 B   | 100                  | 2                        | 0,020      | 2,00            |            |
| 31 A+B | 200                  | 4                        | 0,020      | 2,00            |            |
| 33 A   | 100                  | 3                        | 0,030      | 3,00            | 1,00       |
| 33 B   | 100                  | 3                        | 0,030      | 3,00            | 1,00       |
| 33 A+B | 200                  | 6                        | 0,030      | 3,00            | 1,00       |
| 35 A   | 74                   |                          |            |                 |            |
| 35 B   | 75                   |                          |            |                 |            |
| 35 A+B | 149                  |                          |            |                 |            |

**Tabelle 16.** Strahlensensitivität und Aberrationsspektrum verschiedener Zellzyklusstadien. Häufigkeiten chromatidaler Aberrationen (Achromatische Läsionen: AL, Chromatidenbrüche: B', Chromatidentranslokationen: RB', Isochromatidenbrüche: B'') einschließlich Fragmente. Fragmente wurden nur in Metaphasen ausgewertet, die keine Dizenrischen Chromosomen oder Ringchromosomen enthielten) in unbehandelten Kontrollen (K), nach Bestrahlung im G<sub>0</sub>-Stadium des Zellzyklus (G<sub>0</sub>) und nach 7, 12, 14, 16, 19, 21, 25, 29, 31, 33 und 35 Std. nach Kulturansatz mit Röntgenstrahlen (200 R). Anzahlen der in jeder Serie ausgewerteten Metaphasen siehe Tabelle 15. A, B: Parallelserien

| Serie              | AL | B'     |        |         | RB'    |        |         | B''/Fragmente |        |         |
|--------------------|----|--------|--------|---------|--------|--------|---------|---------------|--------|---------|
|                    |    | Total  | pro    | % Meta- | Total  | pro    | % Meta- | Total         | pro    | % Meta- |
|                    |    | Platte | Platte | phasen  | Platte | Platte | phasen  | Platte        | Platte | phasen  |
| K A                | 3  | 0,030  | 3,00   | 1       | 0,010  | 1,00   |         | 1             | 0,010  | 1,00    |
| K B                | 7  | 0,070  | 6,00   | 1       | 0,010  | 1,00   |         | 1             | 0,010  | 1,00    |
| K A+B              | 10 | 0,050  | 4,50   | 2       | 0,010  | 1,00   |         | 2             | 0,010  | 1,00    |
| G <sub>0</sub> A   | 10 | 0,100  | 10,00  | 2       | 0,020  | 2,00   |         | 16            | 0,160  | 13,00   |
| G <sub>0</sub> B   |    |        |        | 6       | 0,060  | 5,00   |         | 13            | 0,130  | 11,00   |
| G <sub>0</sub> A+B | 10 | 0,050  | 5,00   | 8       | 0,040  | 3,50   |         | 29            | 0,145  | 12,00   |
| 7 A                | 5  | 0,050  | 4,00   | 4       | 0,040  | 4,00   |         | 9             | 0,090  | 8,00    |
| 7 B                | 8  | 0,080  | 8,00   | 3       | 0,030  | 3,00   |         | 12            | 0,120  | 12,00   |
| 7 A+B              | 13 | 0,065  | 6,00   | 7       | 0,035  | 3,50   |         | 21            | 0,105  | 10,00   |

Tabelle 16. Fortsetzung I

| Serie  | AL | B'     |        |         | RB'    |        |         | B''/Fragmente |        |         |
|--------|----|--------|--------|---------|--------|--------|---------|---------------|--------|---------|
|        |    | Total  | pro    | % Meta- | Total  | pro    | % Meta- | Total         | pro    | % Meta- |
|        |    | Platte | phasen | phasen  | Platte | phasen | phasen  | Platte        | phasen | phasen  |
| 12 A   | 3  | 0,030  | 3,00   | 2,00    | 2      | 0,020  | 2,00    | 15            | 0,150  | 14,00   |
| 12 B   | 2  | 0,020  | 2,00   | 2,00    | 2      | 0,020  | 2,00    | 7             | 0,070  | 6,00    |
| 12 A+B | 5  | 0,025  | 2,50   | 2,00    | 2      | 0,020  | 2,00    | 22            | 0,110  | 10,00   |
| 14 A   | 15 | 0,150  | 12,00  | 3,00    | 3      | 0,030  | 3,00    | 8             | 0,080  | 7,00    |
| 14 B   | 11 | 0,110  | 8,00   | 2,00    | 2      | 0,020  | 2,00    | 5             | 0,050  | 5,00    |
| 14 A+B | 26 | 0,130  | 10,00  | 2,50    | 5      | 0,030  | 2,50    | 13            | 0,070  | 6,00    |
| 16 A   | 3  | 0,030  | 3,00   | 2,00    | 2      | 0,020  | 2,00    | 9             | 0,090  | 8,00    |
| 16 B   | 6  | 0,060  | 6,00   | 3,00    | 3      | 0,030  | 3,00    | 11            | 0,110  | 10,00   |
| 16 A+B | 9  | 0,045  | 4,50   | 2,50    | 3      | 0,025  | 2,50    | 20            | 0,100  | 9,00    |
| 19 A   | 3  | 0,039  | 3,95   | 2,63    | 2      | 0,026  | 2,63    | 6             | 0,079  | 7,89    |
| 19 B   | 2  | 0,020  | 1,00   | 1,00    | 1      | 0,010  | 1,00    | 2             | 0,020  | 2,00    |
| 19 A+B | 5  | 0,028  | 2,27   | 1,70    | 3      | 0,017  | 1,70    | 8             | 0,045  | 4,54    |
| 21 A   | 3  | 0,030  | 3,00   | 1,00    | 1      | 0,010  | 1,00    | 9             | 0,090  | 8,00    |
| 21 B   | 3  | 0,030  | 3,00   | 5,00    | 5      | 0,050  | 5,00    | 9             | 0,090  | 8,00    |
| 21 A+B | 6  | 0,030  | 3,00   | 3,00    | 6      | 0,030  | 3,00    | 18            | 0,090  | 8,00    |

Tabelle 16. Fortsetzung II

| Serie  | AL | B'                  |                   |              | RB'    |                   |              | B''/Fragmente |           |                   |
|--------|----|---------------------|-------------------|--------------|--------|-------------------|--------------|---------------|-----------|-------------------|
|        |    | Total pro<br>Platte | % Meta-<br>phasen | Total<br>pro | Platte | % Meta-<br>phasen | Total<br>pro | Platte        | Total pro | % Meta-<br>phasen |
| 25 A   | 1  | 0,038               | 3,85              | 1            | 0,038  | 3,85              |              |               | 4         | 0,154             |
| 25 B   | 2  | 0,095               | 9,52              | 3            | 0,142  | 9,52              |              |               | 2         | 0,095             |
| 25 A+B | 3  | 0,064               | 6,38              | 4            | 0,085  | 8,51              |              |               | 6         | 0,128             |
| 29 A   | 2  | 0,040               | 4,00              | 2            | 0,040  | 4,00              |              |               | 7         | 0,140             |
| 29 B   | 3  | 0,060               | 6,00              | 1            | 0,020  | 2,00              | 1            | 0,020         | 6         | 0,120             |
| 29 A+B | 5  | 0,050               | 5,00              | 3            | 0,030  | 3,00              | 1            | 0,010         | 13        | 0,130             |
| 31 A   | 3  | 0,030               | 3,00              | 2            | 0,020  | 2,00              | 1            | 0,010         | 14        | 0,140             |
| 31 B   | 6  | 0,060               | 6,00              | 4            | 0,040  | 4,00              | 1            | 0,010         | 10        | 0,100             |
| 31 A+B | 9  | 0,045               | 4,50              | 6            | 0,030  | 3,00              | 2            | 0,010         | 24        | 0,120             |
| 33 A   | 1  | 0,010               | 1,00              | 1            | 0,010  | 1,00              |              |               | 6         | 0,060             |
| 33 B   | 7  | 0,070               | 7,00              | 4            | 0,040  | 4,00              | 1            | 0,010         | 7         | 0,070             |
| 33 A+B | 8  | 0,040               | 4,00              | 5            | 0,025  | 2,50              | 1            | 0,005         | 13        | 0,065             |
| 35 A   | 2  | 0,027               | 2,70              | 8            | 0,108  | 9,46              |              |               | 5         | 0,068             |
| 35 B   | 6  | 0,080               | 8,00              | 7            | 0,093  | 9,33              |              |               | 4         | 0,053             |
| 35 A+B | 8  | 0,054               | 5,37              | 15           | 0,100  | 6,71              |              |               | 9         | 0,060             |



Abbildung VI. Metaphaseplatte mit einer Achromatischen Läsion (AL) und zwei Chromatidenbrüchen (B'). Die Achromatischen Läsionen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Mutationsäquivalente, sondern eher Fältelungsdefekte in der Struktur der Metaphasechromosomen. In Grenzfällen ist die Entscheidung, ob eine Achromatische Läsion oder ein Chromatidenbruch vorliegt, schwierig. Die Ausdehnung der Färbelücke spielt hierbei keine Rolle. Entscheidendes Kriterium für eine Wertung als Chromatidenbruch ist die erkennbare Dislokation des Bruchstückes



Abbildung VII. Metaphaseplatte mit einer Chromatiden-translokation (langer Pfeil) und einem Chromatidenbruch (kurzer Pfeil). Im vorliegenden Fall sind die Kinetochoren (oder Zentromere) der beiden an der Translokation beteiligten Chromosomen miteinander verbunden und es könnte in der Anaphase zur sogenannten Brückenbildung kommen ("asymmetrische" Translokation). Ferner sind alle vier der Translokation zugrunde liegende Bruchflächen miteinander verheilt, was durch die Paarungstendenz von Schwesterchromatiden zur Ausbildung der typischen kreuzförmigen Translokationsfigur führt ("vollständige" Translokation).

Bei dem vom Chromatidenbruch betroffenen Chromosom ist das Bruchstück offenbar verlorengegangen

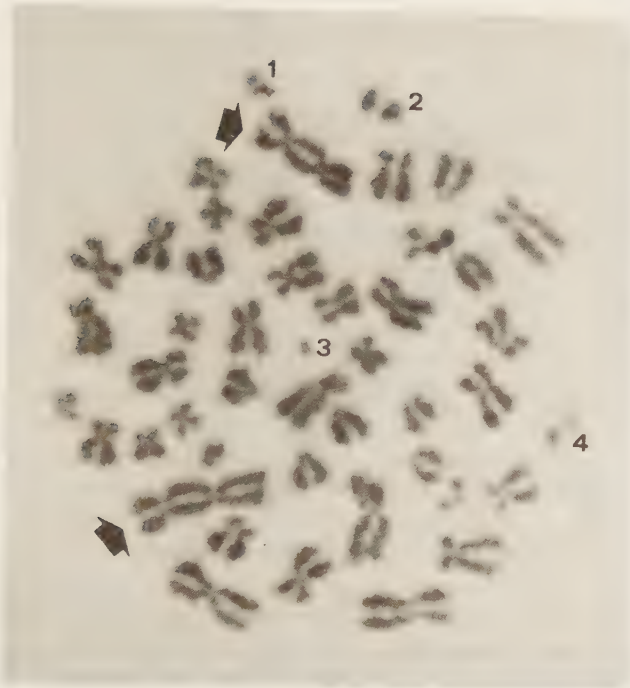


Abbildung VIII. Metaphaseplatte mit zwei Dizentrischen Chromosomen (Pfeile) und dazugehörigen vier Fragmenten (1-4) (vergleiche Abbildung III)

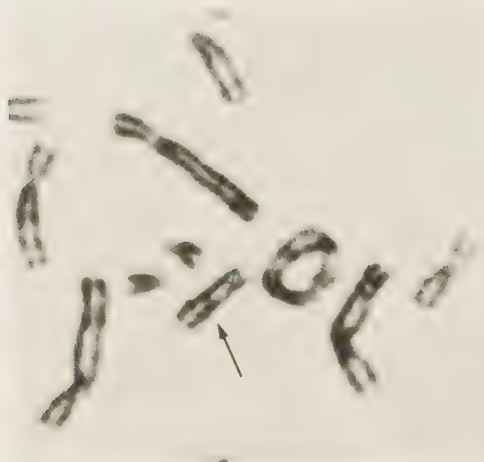


Abbildung IX. Bildausschnitt einer Metaphaseplatte  
mit einem zentrischen Ringchromosom und einem  
dazugehörigen Fragment (Pfeil) (vergleiche Abbil-  
dung IV)

### III. 6) Vorzeitige Chromosomenkondensation (PCC) nach Induktion von Chromosomenmutationen

Im folgenden Experiment wurde der Einfluß unterschiedlicher Dosen von Röntgenstrahlen auf die Induktion vorzeitiger Chromosomenkondensation aus Mikrokernen untersucht.

Es wurden Standard-Leukozytenkulturen in Einwegspritzen angesetzt und jeweils 2 Parallelkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R bestrahlt. 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung erfolgte Zugabe von Colcemid und 2 Std. vor Aufarbeitung Zugabe von  $^3\text{H}$ -TdR. Nach Aufarbeitung der Kulturen 76 1/2 Std. nach Ansatz wurden die Präparate Giemsa-gefärbt und für jede Dosis die Prozentsätze von Metaphasen mit chromatidalen Aberrationen (Chromatidentranslokationen: RB', Triradiale: RB'B''), mit chromosomalen Aberrationen (Dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen), mit vorzeitig kondensiertem Chromatin (PCC), sowie die Prozentsätze tetraploider Zellen (Endoreduplikationen und Polyploidien) ermittelt. Endoreduplikationen können im mikroskopischen Bild durch die Paarung der Schwesterchromosomen von Polyploidien unterschieden werden (siehe Abbildung XV).

Vorzeitig kondensiertes Chromatin aus Mikrokernen konnte nach morphologischen Kriterien wie folgt unterschieden werden: S-PCC: pulverisiert erscheinendes Chromatin ohne sichtbare morphologische Kontinuität (siehe Abbildung XI und XII); G<sub>2</sub>-PCC: leiterartig durchbrochenes, zweisträngiges Chromatin mit erkennbarer morphologischer Kontinuität (siehe Abbildung X); S-G<sub>2</sub>-PCC: eine eindeutige Unterscheidung nach den genannten Kriterien ist nicht möglich.

Ferner wurden die gefundenen PCC nach ihrer Lage in der zugeordneten Mitose klassifiziert: marginale Lage: höchstens ein Chromosom liegt zwischen dem PCC und dem Rand der Metaphaseplatte (siehe Abbildung X und XI);

intermediäre Lage: mehr als ein Chromosom liegt zwischen dem PCC und dem Rand der Metaphaseplatte, das PCC befindet sich jedoch nicht im Zentrum der Metaphase; zentrale Lage: PCC im Zentrum der Metaphaseplatte.

Neben der Auswertung von Mitosen nach den genannten Gesichtspunkten, wurden in allen Serien Interphasezellen ausgewertet und die Prozentsätze von Interphasen ermittelt, die neben einem Hauptkern einen Mikrokern enthielten (siehe Abbildung XVI).

Nach der Auswertung wurden die Präparate in 70% Äthanol entfärbt, anschließend mit Orcein gefärbt und Autoradiographien angefertigt (Von Giemsa-gefärbten Präparaten können keine Autoradiographien angefertigt werden, da die Giemsa-Farbe zur Reduktion des Silberbromid der Filmemulsion zu metallischem Silber führt). Nach Exposition und Entwicklung der Autoradiographien wurden die in allen Serien gefundenen PCC, soweit möglich, auf autoradiographische Markierung untersucht. Zusätzlich wurden in allen Serien Interphasen mit Haupt- und Mikrokern auf autoradiographische Markierung untersucht. Hierbei ergaben sich folgende Auswertungsklassen: Hauptkern (HK) unmarkiert - Mikrokern (MK) unmarkiert, HK markiert - MK markiert, HK markiert - MK unmarkiert, HK unmarkiert - MK markiert (siehe Abbildung XVI).

In einem zusätzlichen Experiment wurden Standard-Leukozytenkulturen angesetzt, 24 Std. nach Ansatz mit 300 R bestrahlt, 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung Colcemid zugegeben und 74 Std. nach Ansatz aufgearbeitet. Die Präparate wurden nach einer Methode zum Nachweis kinetochornahen Heterochromatins (SUMNER, 1972) behandelt und an Interphasezellen mit Haupt- und Mikrokern die Prozentsätze von Zellen mit Mikrokernen ermittelt, in denen kinetochornahes Heterochromatin färbetisch nachweisbar war (siehe Abbildung XVIII). Um Fehlinterpretationen

auszuschließen, wurden nur solche Objektträger zur Auswertung herangezogen, bei denen das kinetochornae Heterochromatin an Metaphasechromosomen eindeutig dargestellt war (siehe Abbildung XVII). Darüber hinaus wurden die entsprechenden Interphasen nur dann der Klasse "Mikrokern ohne kinetochornae Heterochromatin" zugeteilt, wenn im zugeordneten Hauptkern kinetochornae Heterochromatin nachweisbar war.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 17 - 25 und in den Abbildungen 14 - 16 dargestellt.

#### Häufigkeiten aberranter Metaphasen

In Tabelle 17 sind die Anzahlen ausgewerteter Metaphasen, die Prozentsätze von Metaphasen mit chromatidalen Aberrationen (RB' und RB'B''), mit chromosomalen Aberrationen (Dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen), mit vorzeitig kondensiertem Chromatin (PCC), sowie die Prozentsätze von Endoreduplikationen und Polyploidien angegeben, die nach Bestrahlung mit 100, 200, 300, 400 und 500 R in den jeweiligen Parallelserien (A, B) gefunden wurden. Wie aus Tabelle 17 und Abbildung 14 ersichtlich, nehmen die Häufigkeiten von Metaphasen mit chromosomalen Aberrationen mit steigender Röntgenstrahlendosis erheblich zu und stellen zudem in allen Serien die häufigste Klasse aberranter Metaphasen dar. Während im Mittel nach Bestrahlung mit 100 R 6,98% aller ausgewerteten Metaphasen Dizentrische Chromosomen oder Ringchromosomen aufweisen, finden sich bei 200 R 27,69%, bei 300 R 38,06%, bei 400 R 54,28% und bei 500 R 65,06%. Für chromosomale Aberrationen läßt sich somit eine eindeutige Dosis-Effekt-Beziehung nachweisen.

Metaphasen mit chromatidalen Aberrationen wurden in allen Serien in weitaus geringeren Häufigkeiten gefunden (Tabelle 17, Abbildung 14). Die Prozentsätze von Metaphasen

mit chromatidalen Aberrationen nehmen im Mittel von 100 R (1,62%), 200 R (2,01%) und 300 R (3,15%) bis zu 400 R (3,92%) und 500 R (3,91%) nur geringfügig zu.

Die Prozentsätze von Endoreduplikationen schwanken in den einzelnen Serien unregelmäßig zwischen im Mittel 0,20% und 1,50% und zeigen keine Dosis-Effekt-Beziehung (Tabelle 17, Abbildung 15). Die Werte steigen zunächst im Mittel von 100 R (0,20%) bis 200 R (1,50%) an, sinken dann bei 300 R (0,50%) wieder ab und steigen bei 400 R (1,00%) und 500 R (1,20%) erneut leicht an. Im Gegensatz dazu nehmen die Häufigkeiten polyploider Mitosen im Mittel mit steigender Dosis von 100 R (0,80%), 200 R und 300 R (2,10%) bis zu 400 R (3,20%) und 500 R (6,60%) kontinuierlich zu (Tabelle 17, Abbildung 15). Obwohl die Schwankungen zwischen den Parallelserien einzelner Versuche zum Teil recht erheblich sind, kann im Falle der Polyploidien eine Dosis-Effekt-Beziehung angenommen werden.

Die Häufigkeiten von Metaphasen mit PCC schwanken in den einzelnen Serien unregelmäßig zwischen im Mittel 1,78% und 4,14% (Tabelle 17, Abbildung 16). Die Prozentsätze steigen zunächst von 100 R (2,86%) bis 200 R (4,14%) an, sinken von 300 R (3,15%) bis 400 R (1,78%) wieder ab und steigen bei 500 R (3,31%) erneut an. Eine Dosis-Effekt-Beziehung ist somit für Metaphasen mit PCC anhand des vorliegenden Materials nicht nachweisbar.

Im Rahmen der hier verwendeten Versuchsbedingungen traten Metaphasen mit Dizentrischen Chromosomen oder Ringchromosomen demnach am häufigsten auf und zeigten eine eindeutige Dosis-Effekt-Beziehung. Metaphasen mit Chromatidentranslokationen oder Triradialen, mit Endoreduplikationen und Polyploidien, sowie mit vorzeitig kondensiertem Chromatin waren in sehr viel

geringeren Häufigkeiten vorhanden und ließen, mit Ausnahme der Polyploidien, keine Dosis-Effekt-Beziehung erkennen.

### Analyse der PCC-Typen

Vorzeitig kondensiertes Chromatin kann nach morphologischen Kriterien dem Zellzyklusstadium zugeordnet werden, in dem es sich zum Zeitpunkt der Induktion der Kondensation durch Mitosechromatin befand.  $G_1$ -PCC: entsprechend dem unreplizierten Zustand des Chromatins liegen einsträngige, lange und dünne Chromosomen vor. S-PCC: pulverisiert erscheinendes Chromatin ohne morphologisch sichtbare Kontinuität.  $G_2$ -PCC: replizierte zweisträngige Chromosomen, die deutlich länger als normale Mitosechromosomen sind. Entsprechend diesen Kriterien wurde das PCC aus Mikrokernen zunächst morphologisch klassifiziert, wobei gewisse Besonderheiten des "Mikrokern-PCC" auftraten: (1) Die Ausmaße des vorzeitig kondensierten Chromatins waren sehr unterschiedlich (vergl. Abbildung X, XI und XII); (2)  $G_2$ -PCC erschien zumeist leiterartig durchbrochen (siehe Abbildung X) und eine Abgrenzung zu S-PCC war gelegentlich nicht möglich ("S- $G_2$ -PCC").

In Tabelle 18 sind die Häufigkeiten aller PCC-Typen, die in den einzelnen Versuchsserien gefunden wurden angegeben. PCC des S-Phase Typus stellen in allen Serien den bei weitem am häufigsten auftretenden PCC-Typ dar. Danach folgen  $G_2$ -PCC und S- $G_2$ -PCC.  $G_1$ -PCC wurde in keinem Fall gefunden. Ein Einfluß der Röntgenstrahlendosis auf das Verhältnis der verschiedenen PCC-Typen zueinander ist nicht feststellbar. Mit Ausnahme der Serie 400 R, die wahrscheinlich auf die in dieser Serie gefundenen geringen Häufigkeiten von PCC zurückzuführen ist, liegen die Häufigkeiten der S-PCC in allen Serien um 80%. In Tabelle 18 sind zusätzlich die aus allen Serien zusammengefaßten Häufigkeiten der

verschiedenen PCC-Typen angegeben. Demnach sind im Mittel 83,33% aller PCC vom S-Phase-Typ, 12,23% vom G<sub>2</sub>-Phase-Typ und 4,44% vom S-G<sub>2</sub>-Phase-Typ.

Die Verwendung von <sup>3</sup>H-TdR ermöglicht den autoradiographischen Nachweis des S-Phase-Zustands von Chromatin im Zeitraum der Tracerinkubation. In sämtlichen analysierten Mitosen waren die Metaphasechromosomen unmarkiert. Desgleichen waren alle PCC vom G<sub>2</sub>-Typ unmarkiert. Wie aus Tabelle 19 ersichtlich, waren von allen nach Autoradiographie analysierten PCC 39,77% markiert, wobei die S-PCC mit 37,50% den Hauptanteil (= 94,28% aller markierten PCC) ausmachen und der Rest (2,27% = 5,72% aller markierten PCC) auf die S-G<sub>2</sub>-PCC entfällt. Ein Einfluß der Röntgenstrahlendosis auf die Häufigkeiten markierter PCC in den einzelnen Serien ist nicht feststellbar. Für die S-PCC aller Serien läßt sich in 44% der Fälle der tatsächliche S-Phase-Zustand im Zeitraum der Tracerinkubation der Kulturen durch die Markierung nachweisen (Tabelle 20; siehe Abbildung XIII, XIV und XV). Ein Einfluß der Röntgenstrahlendosis auf die Markierungsverhältnisse, etwa im Sinne einer deutlichen Zu- oder Abnahme markierter S-PCC mit steigender Dosis, ist nicht nachweisbar.

Die Analyse der PCC-Positionen innerhalb der zugeordneten Metaphaseplatten (Tabelle 21) ergab, daß von allen gefundenen PCC 80% in marginaler Position, 14,44% in intermediärer und 5,56% in zentraler Position auftreten. Ein Einfluß der Röntgenstrahlendosis auf die relativen Positionen der in den einzelnen Serien gefundenen PCC ist nicht erkennbar.

Insgesamt ergibt sich aus der Analyse der PCC-Typen, daß der bei weitem größte Anteil aller "Mikrokern-PCC" vom S-Phase Typus ist und in marginaler Position gefunden wird. Für annähernd die Hälfte aller zunächst

morphologisch als S-PCC klassifizierten Regionen vorzeitig kondensierten Chromatins läßt sich der tatsächliche S-Phase-Zustand autoradiographisch nachweisen, während alle G<sub>2</sub>-PCC unmarkiert sind. Ein Einfluß der Röntgenstrahlendosis auf die Verhältnisse der PCC-Typen zueinander, auf die Markierungsverhältnisse der PCC oder auf die Lage der PCC innerhalb der zugeordneten Metaphaseplatte ist nicht nachweisbar. Hier muß allerdings auf die geringe Aussagekraft der niedrigen Anzahlen von PCC, die in den einzelnen Serien gefunden wurden, verwiesen werden.

#### Analyse der Mikrokern

In Tabelle 22 sind die Anzahlen ausgewerteter Interphasen, sowie die Häufigkeiten von Interphasen mit Haupt- und Mikrokern, die nach Bestrahlung mit 100, 200, 300, 400 und 500 R in den jeweiligen Parallelserien (A, B) gefunden wurden, angegeben. Die Ergebnisse der Parallelversuche sind in den einzelnen Serien sehr ähnlich. Wie aus Tabelle 22 und Abbildung 16 ersichtlich, nehmen die Prozentsätze mikrokernhaltiger Zellen im Mittel von 100 R (3,00%), 200 R (3,10%) und 300 R (4,40%) bis zu 400 R (4,90%) zu und sinken bei 500 R (4,70%) wieder leicht ab.

Die Ergebnisse der autoradiographischen Analyse von Zellen mit Haupt- und Mikrokern sind in den Tabellen 23 und 24 dargestellt. Für jede Dosis wurden 200 Zellen mit Haupt- und Mikrokern untersucht und den entsprechenden Markierungsklassen zugeordnet (Tabelle 23; Abbildung XVI). Am häufigsten waren (im Mittel 68,10% aller ausgewerteten Interphasen) Zellen mit unmarkiertem Haupt- und Mikrokern, danach folgen Zellen mit markiertem Haupt- und Mikrokern (im Mittel 18,70%) und mit markiertem Haupt- aber unmarkiertem Mikrokern (im Mittel 12,00%). Am seltensten waren Zellen mit unmarkiertem Haupt- aber markiertem Mikrokern (im Mittel 1,20%).

Die zeitliche Begrenzung der DNS-Synthese auf die S-Phase des Zellzyklus ermöglicht bei kurzzeitiger Markierung mit  $^3\text{H}$ -TdR eine Untersuchung der Synchronie von Haupt- und Mikrokern innerhalb des Zellzyklus. Da hierbei nur Zellen herangezogen werden können, bei denen sich zumindest eines der beiden Kernelemente nachweislich in der S-Phase des Zellzyklus befindet, d.h. markiert ist, entfällt die Klasse "HK unmarkiert-MK unmarkiert" für die Beurteilung von Synchronie und Asynchronie, die in diesem Material die häufigste Klasse darstellt (vergl. Tabelle 23). Demnach deutet - unter Berücksichtigung der hier verwendeten Versuchsmethodik - die Markierung beider Kernelemente auf relative Synchronie zwischen Haupt- und Mikrokern, während Alternativmarkierung (HK markiert - MK unmarkiert plus HK unmarkiert - MK markiert) den Schluß auf Asynchronie zuläßt (siehe Abbildung XVI). Entsprechend diesen Gesichtspunkten sind die Häufigkeiten auf Synchronie oder Asynchronie deutender Markierungsklassen in den einzelnen Serien in Tabelle 24 dargestellt. Für im Mittel 41,40% aller beurteilbaren Fälle läßt sich Asynchronie zwischen Haupt- und Mikrokern nachweisen.

Ein Einfluß der Röntgenstrahlendosis auf das Verhältnis der verschiedenen Klassenhäufigkeiten zueinander (Tabelle 23), und damit auch auf das Ausmaß der Asynchronie zwischen Haupt- und Mikrokern in den verschiedenen Versuchsserien (Tabelle 24) ist nicht vorhanden.

Die Untersuchung auf kinetochornahes Heterochromatin ergab, daß in 13,13% aller analysierten Zellen kinetochornahes Heterochromatin im Mikrokern nachweisbar ist (Tabelle 25, Abbildung XVII).

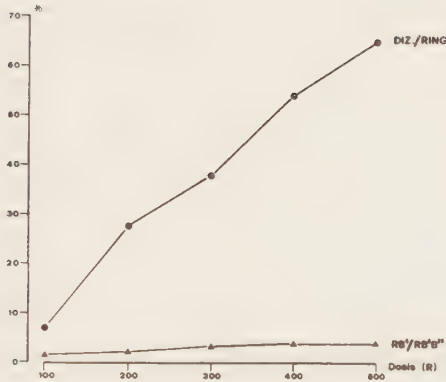


Abbildung 14. Prozentsätze von Metaphasen mit chromosomalen Aberrationen (Dizentrische Chromosomen/Ringchromosomen) und chromatidalen Aberrationen (Chromatidentranslokationen: RB'/Triradiale: RB'B'') nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std. Zusammengefaßte Werte beider Parallelserien (A,B; siehe Tabelle 17)

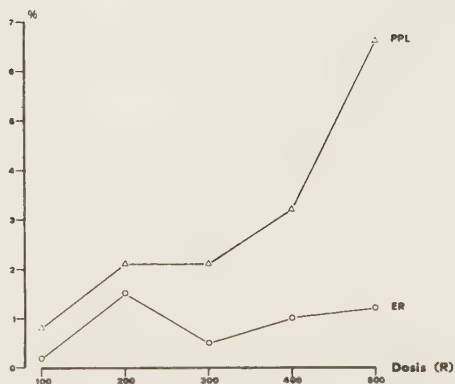


Abbildung 15. Prozentsätze von polyploiden Metaphasen (PPL) und von Endoreduplikationen (ER) nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std. Zusammengefaßte Werte beider Parallelerien (A,B; siehe Tabelle 17)

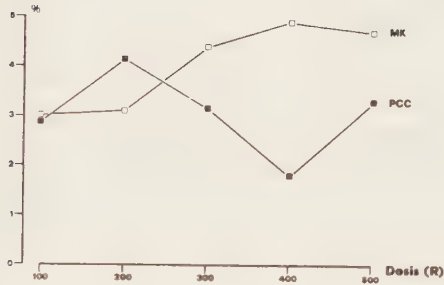


Abbildung 16. Prozentsätze von Metaphasen mit vorzeitig kondensiertem Chromatin (PCC) und Prozentsätze von Interphasen mit Haupt- und Mikrokern (MK) nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std. Zusammengefaßte Werte beider Parallelserien (A,B; siehe Tabelle 17 und 22)

| Serie       | Anzahl aus-<br>gewerteter<br>Metaphasen | Metaphasen mit<br>RB' oder RB'B''<br>(%) | Metaphasen mit<br>Diz. oder Ring<br>(%) | Metaphasen mit<br>PCC<br>(%) | Endoredupli-<br>kationen<br>(%) | Poly-<br>ploiden<br>(%) |
|-------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 100 R A     | 500                                     | 1,00                                     | 7,00                                    | 3,40                         | 0,40                            | 1,40                    |
| 100 R B     | 302                                     | 2,64                                     | 6,95                                    | 1,93                         | 0,00                            | 0,60                    |
| 100 R Total | 802                                     | 1,62                                     | 6,98                                    | 2,86                         | 0,20                            | 0,80                    |
| 200 R A     | 501                                     | 2,59                                     | 25,74                                   | 4,19                         | 1,90                            | 1,70                    |
| 200 R B     | 344                                     | 1,16                                     | 30,52                                   | 4,07                         | 0,80                            | 2,60                    |
| 200 R Total | 845                                     | 2,01                                     | 27,69                                   | 4,14                         | 1,50                            | 2,10                    |
| 300 R A     | 216                                     | 5,09                                     | 42,13                                   | 1,38                         | 0,00                            | 0,90                    |
| 300 R B     | 291                                     | 1,71                                     | 35,05                                   | 4,46                         | 1,00                            | 3,00                    |
| 300 R Total | 507                                     | 3,15                                     | 38,06                                   | 3,15                         | 0,50                            | 2,10                    |
| 400 R A     | 149                                     | 5,36                                     | 51,67                                   | 1,34                         | 1,30                            | 4,60                    |
| 400 R B     | 131                                     | 2,29                                     | 57,25                                   | 2,29                         | 0,70                            | 1,50                    |
| 400 R Total | 280                                     | 3,92                                     | 54,28                                   | 1,78                         | 1,00                            | 3,20                    |
| 500 R A     | 160                                     | 3,75                                     | 63,12                                   | 3,75                         | 0,00                            | 6,20                    |
| 500 R B     | 172                                     | 4,07                                     | 66,86                                   | 2,90                         | 2,30                            | 6,90                    |
| 500 R Total | 332                                     | 3,91                                     | 65,06                                   | 3,31                         | 1,20                            | 6,60                    |

Tabelle 17. Prozentsätze von Metaphasen mit chromatidalen Aberrationen (Chromatidentranslokationen: RB'/Triradiale: RB'B''), mit chromosomalen Aberrationen (Dizentrische Chromosomen/Ringchromosomen), mit vorzeitig kondensiertem Chromatin (PCC) und Prozentsätze von Endoreduplikationen und Polyploidien nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen mit 100, 200, 300, 400 und 500 R 24 Std. nach Ansatz, sowie Anzahlen in jeder Serie (A, B: Parallelserien) ausgewerteter Metaphasen. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std.

| Serie                | Anzahl | S-PCC |       | G <sub>2</sub> -PCC |       | S-G <sub>2</sub> -PCC |       |
|----------------------|--------|-------|-------|---------------------|-------|-----------------------|-------|
|                      |        | PCC   | Total | %                   | Total | %                     | Total |
| 100 R (A+B)          | 23     |       | 18    | 78,26               | 4     | 17,39                 | 1     |
| 200 R (A+B)          | 35     |       | 29    | 82,86               | 4     | 11,43                 | 2     |
| 300 R (A+B)          | 16     |       | 14    | 87,50               | 2     | 12,50                 | 0     |
| 400 R (A+B)          | 5      |       | 5     | 100,00              | 0     | 0,00                  | 0     |
| 500 R (A+B)          | 11     |       | 9     | 81,82               | 1     | 9,09                  | 1     |
| 100 - 500 R<br>(A+B) | 90     |       | 75    | 83,33               | 11    | 12,23                 | 4     |

Tabelle 18. Häufigkeiten verschiedener Klassen vorzeitig kondensierten Chromatins (PCC) nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std. Anzahlen analysierter PCC (zusammengefaßte Werte der beiden Parallelserien A und B), sowie Anteile von S-PCC, G<sub>2</sub>-PCC und S-G<sub>2</sub>-PCC

| Serie                | Anzahl PCC<br>nach Auto-<br>radiographie | Markierte PCC<br>(S+S-G <sub>2</sub> ) |       | Markierte<br>S-PCC |       | Markierte<br>S-G <sub>2</sub> -PCC |      |
|----------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|-------|--------------------|-------|------------------------------------|------|
|                      |                                          | Total                                  | %     | Total              | %     | Total                              | %    |
| 100 R (A+B)          | 21                                       | 7                                      | 33,33 | 7                  | 33,33 | 0                                  | 0,00 |
| 200 R (A+B)          | 35                                       | 18                                     | 51,43 | 16                 | 45,71 | 2                                  | 5,71 |
| 300 R (A+B)          | 16                                       | 4                                      | 25,00 | 4                  | 25,00 | 0                                  | 0,00 |
| 400 R (A+B)          | 5                                        | 2                                      | 40,00 | 2                  | 40,00 | 0                                  | 0,00 |
| 500 R (A+B)          | 11                                       | 4                                      | 36,36 | 4                  | 36,36 | 0                                  | 0,00 |
| 100 - 500 R<br>(A+B) | 88                                       | 35                                     | 39,77 | 33                 | 37,50 | 2                                  | 2,27 |

Tabelle 19. Autoradiographische Analyse vorzeitig kondensierten Chromatins (PCC) nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std. Anzahlen analysierter PCC (zusammengefaßte Werte der beiden Parallelserien A und B), sowie Häufigkeiten <sup>3</sup>H-TdR-markierter PCC, markierter S-PCC und markierter S-G<sub>2</sub>-PCC

| Serie                | Anzahl S-PCC nach<br>Autoradiographie | Markierte S-PCC<br>Total<br>% |
|----------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 100 R (A+B)          | 18                                    | 7 38,89                       |
| 200 R (A+B)          | 29                                    | 16 55,17                      |
| 300 R (A+B)          | 14                                    | 4 28,57                       |
| 400 R (A+B)          | 5                                     | 2 40,00                       |
| 500 R (A+B)          | 9                                     | 4 44,44                       |
| 100 - 500 R<br>(A+B) | 75                                    | 33 44,00                      |

Tabelle 20. Autoradiographische Analyse vorzeitig kondensierten Chromatins (PCC) des S-Phase-Typus (S-PCC), induziert durch Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std. Anzahlen analysierter PCC (zusammengefaßte Werte der beiden Parallelserien A und B), sowie Häufigkeiten  $^3\text{H}$ -TdR-markierter S-PCC

| Serie                | PCC-Positionen |       |             |       |         |       |
|----------------------|----------------|-------|-------------|-------|---------|-------|
|                      | marginal       |       | intermediär |       | zentral |       |
|                      | Total          | %     | Total       | %     | Total   | %     |
| 100 R (A+B)          | 17             | 73,91 | 6           | 26,09 | 0       | 0,00  |
| 200 R (A+B)          | 27             | 77,14 | 5           | 14,29 | 3       | 8,57  |
| 300 R (A+B)          | 15             | 93,75 | 1           | 6,25  | 0       | 0,00  |
| 400 R (A+B)          | 4              | 80,00 | 0           | 0,00  | 1       | 20,00 |
| 500 R (A+B)          | 9              | 81,82 | 1           | 9,09  | 1       | 9,09  |
| 100 - 500 R<br>(A+B) | 72             | 80,00 | 13          | 14,44 | 5       | 5,56  |

Tabelle 21. Häufigkeiten verschiedener Positionen vorzeitig kondensierten Chromatins (PCC) in der Metaphaseplatte nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatze mit 100, 200, 300, 400 und 500 R. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std. Anzahlen analysierter PCC (zusammengefaßte Werte aller PCC-Typen der beiden Parallelserien A und B), sowie Häufigkeiten von PCC in marginaler, intermediärer und zentraler Lage

| Serie       | Anzahl ausgewer-<br>teter Interphasen | Interphasen mit Mikrokern |      |
|-------------|---------------------------------------|---------------------------|------|
|             |                                       | Total                     | %    |
| 100 R A     | 1000                                  | 30                        | 3,00 |
| 100 R B     | 1000                                  | 30                        | 3,00 |
| 100 R Total | 2000                                  | 60                        | 3,00 |
| 200 R A     | 1000                                  | 27                        | 2,70 |
| 200 R B     | 1000                                  | 35                        | 3,50 |
| 200 R Total | 2000                                  | 62                        | 3,10 |
| 300 R A     | 1000                                  | 43                        | 4,30 |
| 300 R B     | 1000                                  | 45                        | 4,50 |
| 300 R Total | 2000                                  | 88                        | 4,40 |
| 400 R A     | 1000                                  | 52                        | 5,20 |
| 400 R B     | 1000                                  | 46                        | 4,60 |
| 400 R Total | 2000                                  | 98                        | 4,90 |
| 500 R A     | 1000                                  | 48                        | 4,80 |
| 500 R B     | 1000                                  | 46                        | 4,60 |
| 500 R Total | 2000                                  | 94                        | 4,70 |

**Tabelle 22.** Prozentsätze von Interphasezellen mit Haupt- und Mikrokern nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R, sowie Anzahlen in jeder Serie (A, B: Parallelserien) ausgewerteter Interphasen. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std.

| Serie             | Anzahl analysierter Zellen mit Hauptkern (HK) und Mikrokern (MK) | Markierungsverhältnisse |       |             |       |               |       |             |      |
|-------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------|-------------|-------|---------------|-------|-------------|------|
|                   |                                                                  | HK unmarkiert           |       | HK markiert |       | MK unmarkiert |       | MK markiert |      |
|                   |                                                                  | Total                   | %     | Total       | %     | Total         | %     | Total       | %    |
| 100 R (A+B)       | 200                                                              | 141                     | 70,50 | 34          | 17,00 | 23            | 11,50 | 2           | 1,00 |
| 200 R (A+B)       | 200                                                              | 132                     | 66,00 | 38          | 19,00 | 27            | 13,50 | 3           | 1,50 |
| 300 R (A+B)       | 200                                                              | 135                     | 67,50 | 42          | 21,00 | 21            | 10,50 | 2           | 1,00 |
| 400 R (A+B)       | 200                                                              | 143                     | 71,50 | 34          | 17,00 | 23            | 11,50 | 0           | 0,00 |
| 500 R (A+B)       | 200                                                              | 130                     | 65,00 | 39          | 19,50 | 26            | 13,00 | 5           | 2,50 |
| 100 - 500 R (A+B) | 1000                                                             | 681                     | 68,10 | 187         | 18,70 | 120           | 12,00 | 12          | 1,20 |

Tabelle 23. Autoradiographische Analyse von Zellen mit Haupt (HK)- und Mikrokern (MK) nach Röntgen-

bestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std. Anzahlen analysierter Zellen mit Haupt- und Mikrokern (zusammengefaßte Werte der beiden Parallelserien A und B), sowie Häufigkeiten <sup>3</sup>H-TdR-markierter, bzw. unmarkierter Zellen folgender Klassen: HK unmarkiert - MK unmarkiert, HK markiert, HK markiert - MK markiert, HK markiert - MK unmarkiert, HK unmarkiert - MK markiert

| Serie                | Anzahl analysierter<br>Zellen mit markier-<br>tem Hauptkern (HK)<br>und/oder Mikrokern<br>(MK) | Synchronie                     |       | Asynchronie                                                              |       |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------|-------|
|                      |                                                                                                | (HK markiert -<br>MK markiert) |       | (HK markiert - MK<br>unmarkiert + HK un-<br>markiert - MK mar-<br>kiert) |       |
|                      |                                                                                                | Total                          | %     | Total                                                                    | %     |
| 100 R (A+B)          | 59                                                                                             | 34                             | 57,60 | 25                                                                       | 42,40 |
| 200 R (A+B)          | 68                                                                                             | 38                             | 55,90 | 30                                                                       | 44,10 |
| 300 R (A+B)          | 65                                                                                             | 42                             | 64,60 | 23                                                                       | 35,40 |
| 400 R (A+B)          | 57                                                                                             | 34                             | 59,60 | 23                                                                       | 40,40 |
| 500 R (A+B)          | 70                                                                                             | 39                             | 55,70 | 31                                                                       | 44,30 |
| 100 - 500 R<br>(A+B) | 319                                                                                            | 187                            | 58,60 | 132                                                                      | 41,40 |

Tabelle 24. Autoradiographische Analyse von Zellen mit Haupt (HK)- und Mikrokern (MK) nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 100, 200, 300, 400 und 500 R. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 76 1/2 Std. Anzahlen analysierter Zellen mit H-TdR-markiertem HK und/oder MK (zusammengefaßte Werte der beiden Parallelserien A und B), sowie Häufigkeiten von Markierungsmustern, die auf relative Synchronie von HK und MK (Klasse: HK markiert - MK markiert), oder Asynchronie zwischen HK und MK (Klasse: HK markiert - MK unmarkiert + HK unmarkiert - MK markiert) schließen lassen

| Dosis<br>(R) | Anzahl analysierter<br>Zellen mit Haupt-<br>und Mikrokern | Mikrokern ohne<br>kinetochornahes<br>Heterochromatin<br>Total | Mikrokern mit<br>kinetochornahem<br>Heterochromatin<br>Total | %<br>% |
|--------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------|
| 300          | 259                                                       | 225                                                           | 34                                                           | 13,13  |

Tabelle 25. Häufigkeiten von Mikrokernen mit und ohne färberisch nachweisbarem kinetochornahem Heterochromatin nach Röntgenbestrahlung von Leukozytenkulturen 24 Std. nach Ansatz mit 300 R, sowie Anzahl analysierter Zellen mit Haupt- und Mikrokern. Zugabe von Colcemid 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 74 Std.

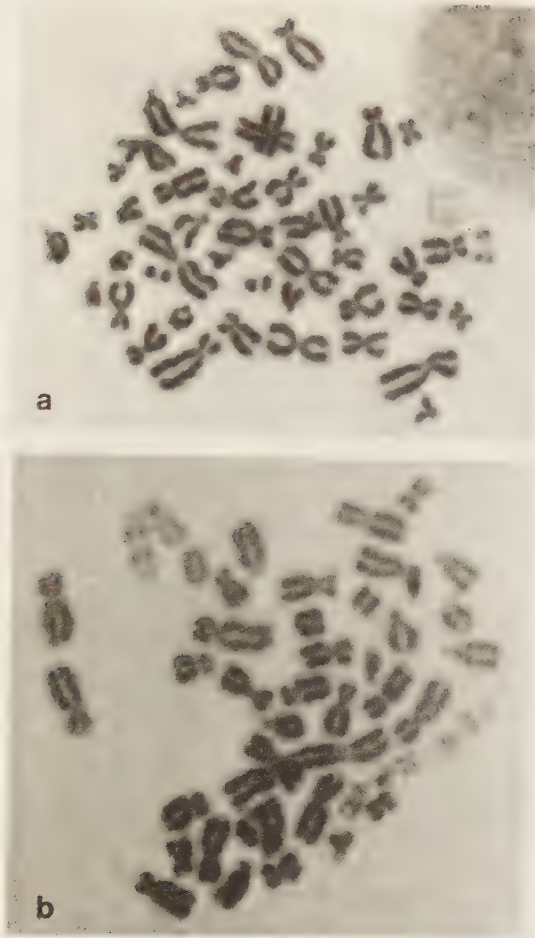


Abbildung X. Metaphaseplatten mit einem (a) und zwei (b) vorzeitig kondensierten Chromatinbe-  
reichen (PCC) des  $G_2$ -Typs in marginaler Lage:  
leiterartig durchbrochenes, zweisträngiges  
Chromatin mit erkennbarer morphologischer Kon-  
tinuität.  
Beide Metaphasen enthalten außerdem Dizentrische  
Chromosomen

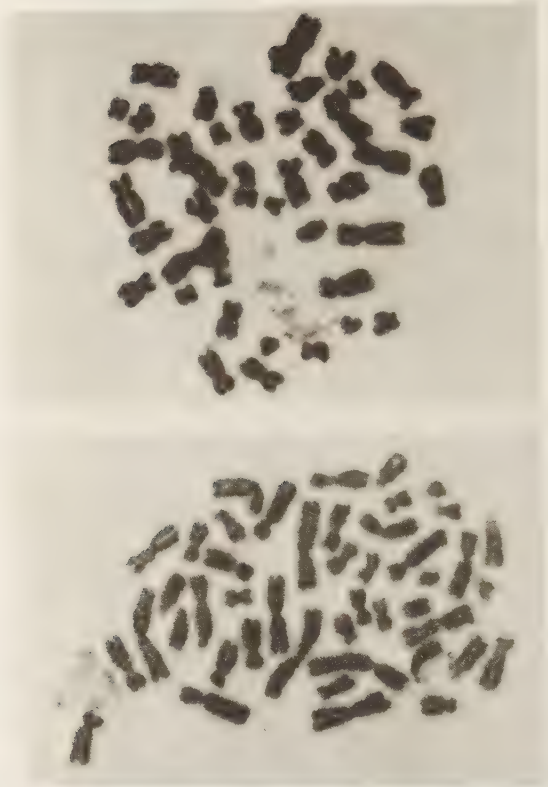


Abbildung XI. Metaphaseplatten mit je einem Bereich vorzeitig kondensierten Chromatins (PCC) des S-Typs in marginaler Lage: pulverisiert erscheinendes Chromatin ohne sichtbare morphologische Kontinuität

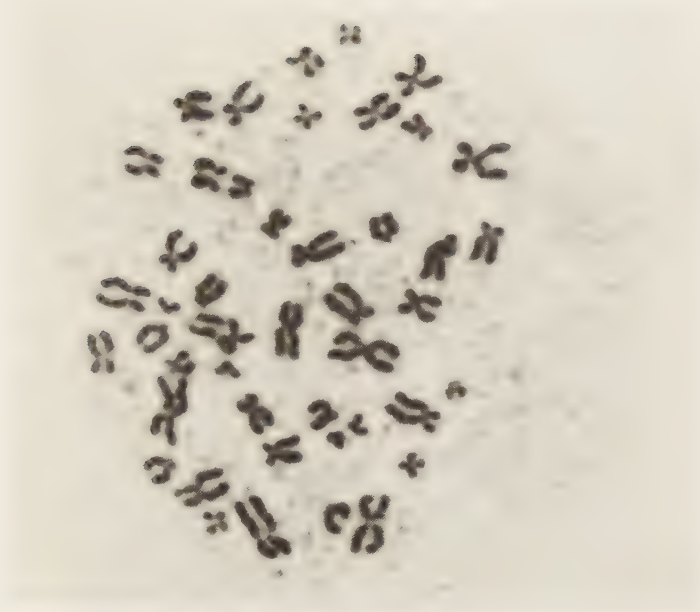


Abbildung XII. Metaphaseplatte mit ausgedehntem vorzeitig kondensiertem Chromatin (PCC) des S-Typs. Die große Menge von PCC, sowie die Anwesenheit von 46 Metaphasechromosomen lassen die Entstehung aus einer mehrkernigen (poly-ploiden) Zelle vermuten



Abbildung XIII. Metaphase mit einem  $^3\text{H}$ -TdR-markierten Bereich vorzeitig kondensierten Chromatins (PCC) des S-Typs in marginaler Lage. Autoradiographische Markierung ausschließlich über dem PCC

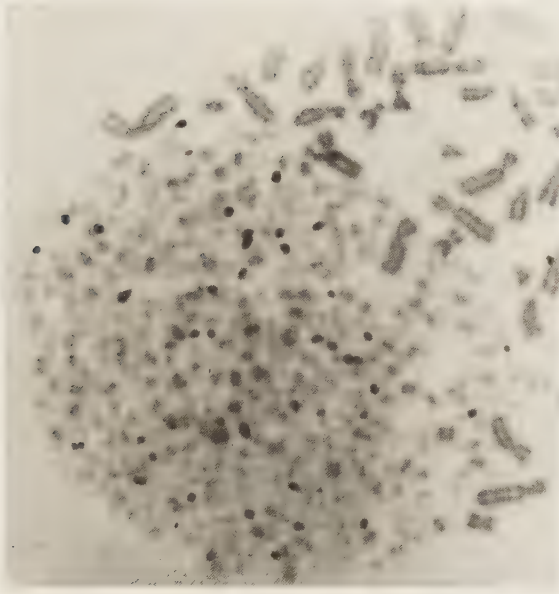


Abbildung XIV. Bildausschnitt einer Metaphaseplatte mit ausgedehntem  $^3\text{H}$ -TdR-markiertem vorzeitig kondensiertem Chromatin (PCC) des S-Typs. Autoradiographische Markierung ausschließlich über dem PCC

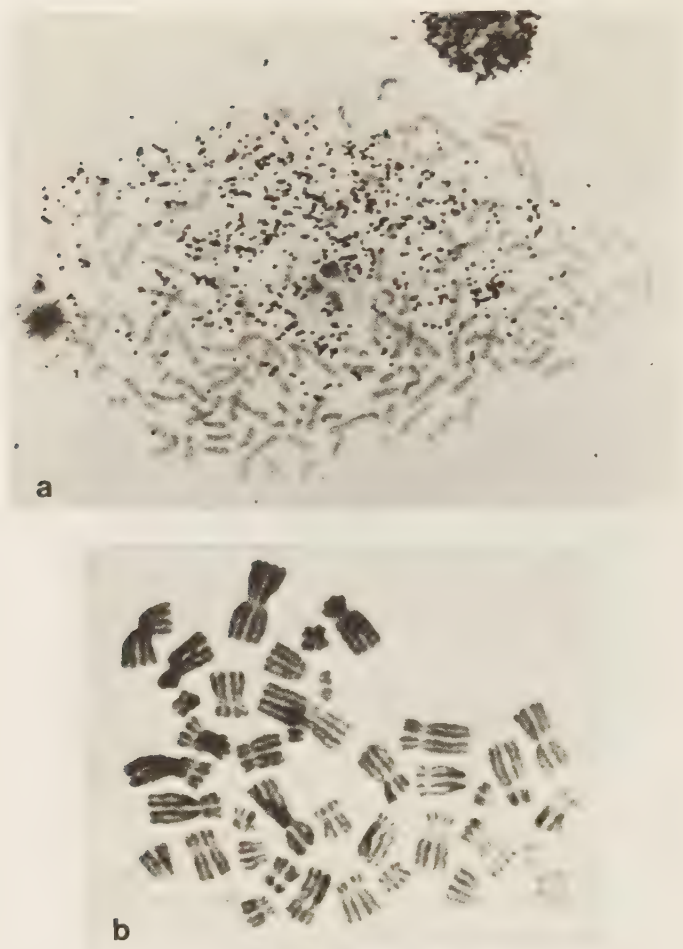


Abbildung XV. (a) Polyploide Metaphase mit ausgedehntem  $^3\text{H}$ -TdR-markiertem vorzeitig kondensiertem Chromatin (PCC) des S-Typs. Autoradiographische Markierung ausschließlich über dem PCC. (b) Endoreduplikation, die im mikroskopischen Bild durch die auffällige Paarung der Schwesterchromosomen von "normalen" Polyploidien unterschieden werden kann. Derartige Mitosen leiten sich von Zellen ab, bei denen in der Interphase nacheinander zwei Replikationszyklen der Chromosomen abliefen

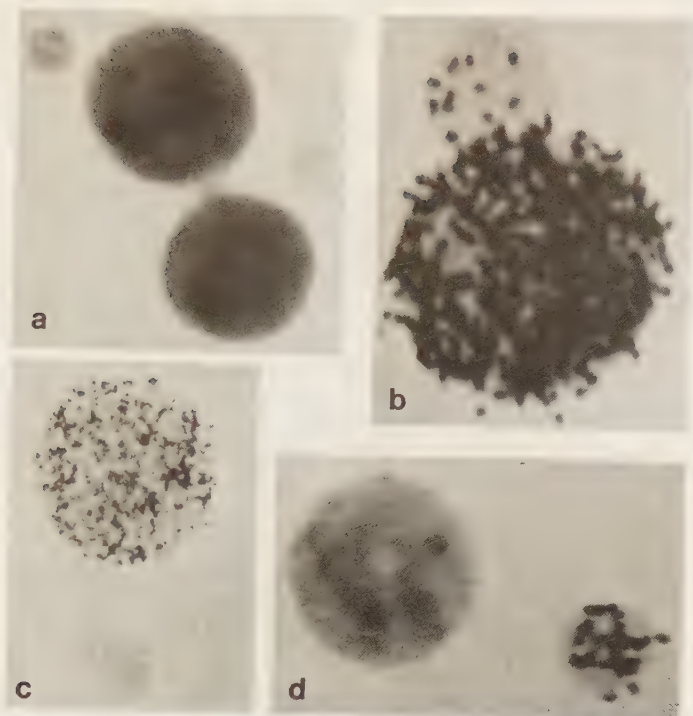


Abbildung XVI. Interphasekerne mit Mikrokokernen.

Autoradiographische Analyse der Markierungs-  
verhältnisse nach Behandlung mit  $^3\text{H}$ -TdR.

Markierungsklassen: (a) Haupt- und Mikrokokern  
unmarkiert; (b) Haupt- und Mikrokokern markiert;  
(c) Hauptkokern markiert, Mikrokokern unmarkiert;  
(d) Hauptkokern unmarkiert, Mikrokokern markiert.

Alternativmarkierung (c,d) deutet auf Asyn-  
chronie zwischen den beiden Kernelementen.

In (a) sind möglicherweise zwei Hauptkerne  
einer polyploiden Zelle dargestellt, die durch  
eine "Brücke" miteinander verbunden sind. Bei-  
de Kerne erscheinen mit je einem Mikrokokern  
assoziiert

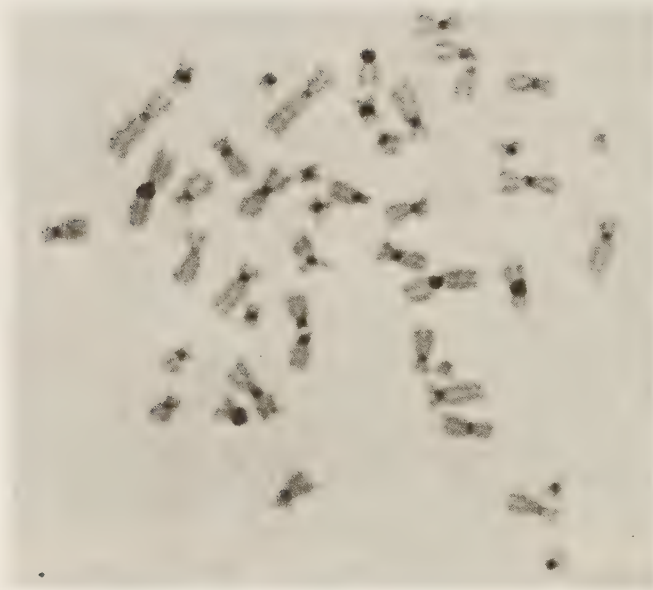


Abbildung XVII. Kinetochornahes Heterochromatin  
in Metaphasechromosomen



Abbildung XVIII. Kinetochornahes Heterochroma-  
tin in Mikrokernen (Pfeile)

III. 7) Differenzierung von Schwesterchromatiden  
durch BUdR-Markierung

Durch Inkorporation des Thymidin-Analogons Bromdesoxyuridin (BUdR) und spätere DNS de- und renaturierende Behandlungen der Präparate (vergl. Material und Methode, II. 3) ist eine färbetische Differenzierung von Schwesterchromatiden möglich. Entsprechend der semikonservativen Verteilung neusynthetisierter DNS weisen Mitosechromosomen ein spezifisches Färbungsmuster auf, je nachdem, ob in dem betreffenden Chromatinbereich eine in beiden Einzelsträngen BUdR-substituierte DNS vorliegt, oder ob nur in einem Strang der DNS Thymin durch BUdR ersetzt wurde (siehe Abbildung XIX). Mit dieser Methode sind in der vorliegenden Arbeit die Häufigkeiten erster, zweiter und dritter Mitosen nach 72-stündiger Kulturdauer, sowie Schwesterchromatidenaustausche (SCE) untersucht worden.

7 A) Häufigkeiten erster, zweiter und dritter Mitosen  
nach dreitägiger Kulturdauer

Standard-Leukozytenkulturen (Kultivierung in Glasflaschen) wurde 24 Std. nach Ansatz, unmittelbar vor der ersten DNS-Synthesephase in diesem Kultursystem, BUdR zugegeben (Endkonzentration:  $10^{-5}$ M). Die Colcemidzugabe erfolgte 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 72 Std. Nach der Aufarbeitung wurden die Präparate entsprechend der angegebenen Methode (Material und Methode, II. 3) behandelt und Metaphasen auf Färbungsmuster untersucht, die der ersten, zweiten oder dritten Mitose nach Inkorporation von BUdR entsprechen. In ersten Mitosen nach BUdR-Zugabe sind beide Chromatiden der Chromosomen gleich stark anfärbbar, bei zweiten Mitosen läßt sich in allen Chromosomen nur eine Chromatide ( die nur in einem DNS-Strang BUdR-substituierte) stark anfärben, die andere (in beiden DNS-Strängen substituierte) weist eine schwächere Anfärbbarkeit auf (siehe Abbildung XIX). In dritten Mitosen nach Zugabe von BUdR treten Chromosomen auf, deren beide

Chromatiden nur schwach anfärbbar sind, oder auch Chromosomen, die sich nur in einem bestimmten Bereich einer Chromatide stark anfärben lassen.

Von 227 analysierten Metaphasen waren 44 (= 19,38%) erste, 130 (= 57,27%) zweite und 53 (= 23,35%) dritte Mitosen nach Zugabe von BUdR. Dieser Befund zeigt, daß nach dreitägiger Kulturdauer erste, zweite und dritte Mitosen nach Ansatz nebeneinander auftreten, wobei mehr als die Hälfte aller Mitosen zweite Mitosen nach Kulturbeginn sind.

7 B) Schwesterchromatidenaustausche (SCE) und Chromosomenaberrationen nach Chemomutagenbehandlung

Standard-Leukozytenkulturen wurden in Glasflaschen angesetzt und 24 Std. nach Ansatz BUdR zugegeben (Endkonzentration:  $10^{-5}M$ ). Verschiedene Kulturen erhielten zusätzlich 24 Std. vor Aufarbeitung Trenimon (Endkonzentration:  $10^{-8}M$ ). Die Colcemidzugabe erfolgte bei allen Kulturen 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung nach 72 Std. Sowohl von nur BUdR-behandelten (Serie BU), als auch von BUdR- und Trenimon-behandelten (Serie BU Tren.) Kulturen wurde nach Aufarbeitung ein Teil der Präparate auf differenzielle Schwesterchromatidenfärbung behandelt, ein anderer Teil "normal" Giemsa-gefärbt. In beiden Serien wurden Metaphasen mit differenzieller Schwesterchromatidenfärbung (zweite Mitosen nach BUdR-Zugabe) auf Schwesterchromatidenaustausche (SCE) (siehe Abbildung XIX), sowie "normal" Giemsa-gefärbte Metaphasen auf Chromosomenaberrationen untersucht.

Wie aus Tabelle 26 ersichtlich, wurden in lediglich BUdR-behandelten Kulturen im Durchschnitt 5,25 SCE

pro Metaphaseplatte gefunden, während nach zusätzlicher Trenimonbehandlung ein durchschnittlicher Wert von 14,65 SCE pro Metaphaseplatte festgestellt wurde. Somit erhöht das alkylierende Chemomutagen Trenimon im Rahmen der angegebenen Versuchsbedingungen und der hier verwendeten Konzentration die Häufigkeiten von Schwesterchromatidenaustauschen in menschlichen Leukozytenchromosomen auf annähernd das Dreifache. Die Häufigkeitsverteilungen von SCE pro Metaphaseplatte in den beiden Serien BU und BU Tren. sind in Abbildung 17 dargestellt. In allen analysierten Metaphaseplatten beider Serien traten SCE auf, im Minimum 1 SCE pro Zelle. In der nur BUdR-behandelten Serie fanden sich Metaphasen mit maximal 12 SCE, wobei am häufigsten Metaphasen mit 5 SCE gefunden wurden. In der Trenimon-behandelten Serie wurden bis zu 30 SCE pro Zelle festgestellt, während Metaphasen mit 17 SCE am häufigsten waren.

In Tabelle 27 sind die Häufigkeiten von Chromosomenaberrationen (Achromatische Läsionen: AL, Chromatidenbrüche: B', Isochromatidenbrüche: B'', Chromatidentranslokationen: RB') sowie die daraus errechneten Häufigkeiten der Bruchereignisse pro Zelle ("Bruchrate";  $AL \text{ entfällt, } B' = 1, B'', RB' = 2$  Bruchereignisse) in der BUdR- und in der BUdR+Trenimon-behandelten Serie angegeben. In der Serie BU wurden AL, B' und B'' in geringen Häufigkeiten gefunden, die Bruchrate beläuft sich auf 0,040 Bruchereignisse pro Zelle. Demgegenüber war in der Serie BU Tren. eine leichte Erhöhung der Häufigkeiten von AL, B' und B'' zu verzeichnen. Zusätzlich wurde in dieser Serie eine Chromatidentranslokation gefunden. Die Bruchrate in der Serie BU Tren. ist mit 0,140 Bruchereignissen pro Zelle gegenüber der Serie BU um mehr als das Dreifache erhöht.

Ein Vergleich der Häufigkeiten von Schwesterchromatidenaustauschen (Tabelle 26) und Bruchereignissen (Tabelle 27) pro Zelle zeigt, daß SCE in beiden Serien ungefähr 100-fach häufiger auftreten als Bruchereignisse.

7 C) Schwesterchromatidenaustausche (SCE) und Chromosomenaberrationen nach Bleiacetatbehandlung

Für dieses Experiment wurden Standard-Leukozytenkulturen in Glasflaschen angesetzt und 72 Std. lang kultiviert. Die Colcemidzugabe erfolgte 4 1/2 Std. vor Aufarbeitung. Neben unbehandelten Kulturen (Nullkontrolle: K0) wurden Parallelserien wie folgt behandelt: Serie BU: Zugabe von BUdR (Endkonzentration:  $10^{-5}\text{M}$ ) 24 Std. nach Ansatz; Serie BU Na: Zugabe von BUdR (Endkonzentration:  $10^{-5}\text{M}$ ) 24 Std. nach Ansatz, Zugabe von Natriumacetat (Endkonzentration:  $10^{-5}\text{M}$ ) 24 Std. vor Aufarbeitung; Serie BU Pb: Zugabe von BUdR (Endkonzentration:  $10^{-5}\text{M}$ ) 24 Std. nach Ansatz, Zugabe von Bleiacetat (Endkonzentration:  $10^{-5}\text{M}$ ) 24 Std. vor Aufarbeitung. "Normal"-Giemsa-gefärbte Präparate aller Serien wurden nach Aufarbeitung der Kulturen auf Chromosomenaberrationen untersucht. An auf differenzielle Schwesterchromatidenfärbung behandelten Präparaten wurden in 2. Mitosen nach BUdR-Zugabe die Häufigkeiten von SCE in den Serien BU, BU Na und BU Pb bestimmt.

Wie Tabelle 28 zeigt, fanden sich in lediglich BUdR-behandelten Kulturen in diesem Experiment im Mittel 4,10 SCE pro Metaphaseplatte. Die SCE-Häufigkeiten in zusätzlich mit Natriumacetat (4,57 SCE pro Metaphaseplatte) oder Bleiacetat (4,61 SCE pro Metaphaseplatte) behandelten Serien liegen im Bereich der nur mit BUdR behandelten Serie. Die Ergebnisse der Parallelserien sind in allen Fällen sehr ähnlich.

Ein Wert von 4 SCE pro Metaphaseplatte wird in keinem Fall unterschritten, ein Wert von 5 SCE pro Metaphaseplatte in keiner Serie erreicht. Damit erhöht eine Behandlung mit Bleiacetat oder Natriumacetat (Kontrollsubstanz für das Acetation) im Rahmen der angegebenen Versuchsbedingungen und der hier verwendeten Konzentration die Häufigkeiten von SCE in menschlichen Leukozytenchromosomen nicht. Die Häufigkeitsverteilungen von SCE pro Metaphaseplatte sind in den Serien BU, BU Na und BU Pb ähnlich (Abbildung 18). In allen drei Experimenten wurden auch Metaphasen ohne SCE in geringen Häufigkeiten gefunden. In der Serie BU traten bis zu 10 SCE pro Metaphase auf, die meisten analysierten Metaphasen enthielten 4 SCE. In der Serie BU Na fanden sich bis zu 13 SCE pro Metaphaseplatte, während die meisten Metaphasen in dieser Serie 2 SCE aufwiesen. In der Serie BU Pb wurden bis zu 14 SCE pro Metaphase gefunden, Zellen mit 5 SCE sind hier am häufigsten.

Die Häufigkeiten von Chromosomenaberrationen (Achromatische Läsionen: AL, Chromatidenbrüche: B', Isochromatidenbrüche: B'') liegen in allen Serien im Bereich der unbehandelten Kontrolle (Tabelle 29), mit Ausnahme der AL, die in der mit Bleiacetat behandelten Serie eine leichte Erhöhung aufweisen. Einen bequemen Vergleich ermöglichen die Gesamtzahlen der Bruchereignisse pro Zelle ("Bruchrate"; Berechnung s.o.), bei denen die AL als zweifelhafte Mutationsäquivalente entfallen. Die niedrigste Bruchrate findet sich in der BUDR- und Bleiacetat-behandelten Serie.

Ein Vergleich der Häufigkeiten von SCE (Tabelle 28) und Bruchereignissen (Tabelle 29) pro Zelle zeigt, daß in den Serien BU, BU Na und BU Pb SCE ungefähr 100-400 mal häufiger auftreten als Bruchereignisse (Serie BU Na: SCE-Rate 4,57 : Bruchrate 0,05; Serie BU: SCE-Rate 4,10 : Bruchrate 0,02; Serie BU Pb: SCE-Rate 4,61 : Bruchrate 0,01).

| Serie    | Behandlung<br>(Konz.)                                                    | Anzahl ana-<br>lysierter<br>Metaphasen | SCE<br>pro Metaphase |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------|
| BU       | BUdR<br>( $10^{-5}$ <u>M</u> )                                           | 40                                     | 5,25                 |
| BU Tren. | BUdR<br>( $10^{-5}$ <u>M</u> )<br><br>Trenimon<br>( $10^{-8}$ <u>M</u> ) | 40                                     | 14,65                |

Tabelle 26. Häufigkeiten von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) pro Metaphaseplatte nach Bromdesoxyuridin (BUdR)-Behandlung (Serie BU, Experiment 7 B) und nach BUdR- und Trenimonbehandlung (Serie BU Tren., Experiment 7 B), sowie Anzahlen von in beiden Serien analysierten Metaphasen. Kulturdauer 72 Std., einschließlich 4 1/2 Std. Colcemidbehandlung. Zugabe von BUdR 24 Std. nach Ansatz, Zugabe von Trenimon 48 Std. nach Ansatz

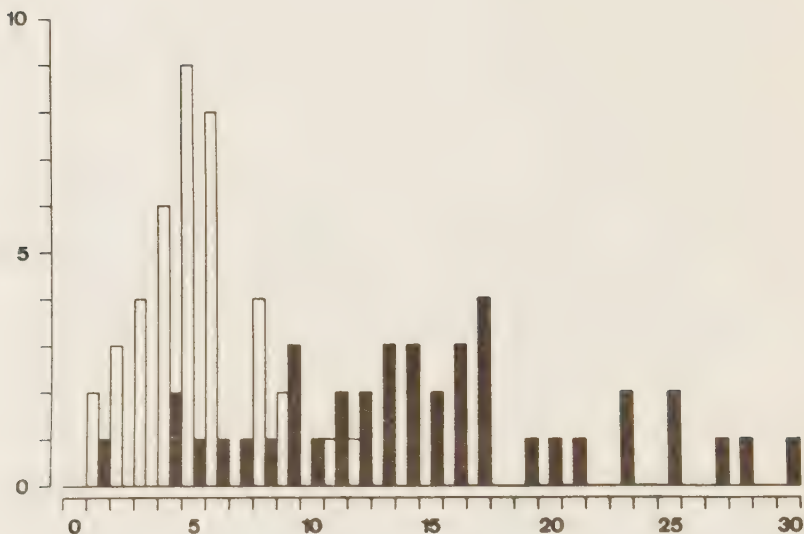


Abbildung 17. Häufigkeiten von Metaphasen (Ordinate) mit unterschiedlichen Anzahlen von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) (Abszisse) nach Bromdesoxyuridin (BUdR)-Behandlung (Helle Säulen; Serie BU, Experiment 7 B) und nach BUdR- und Trenimonbehandlung (Dunkle Säulen; Serie BU Tren., Experiment 7 B). Kulturdauer: 72 Std., einschließlich 4 1/2 Std. Colcemidbehandlung. Zugabe von BUdR (Endkonzentration:  $10^{-5}\text{M}$ ) 24 Std. nach Ansatz, Zugabe von Trenimon (Endkonzentration:  $10^{-8}\text{M}$ ) 48 Std. nach Ansatz

| Serie    | Behandlung (Konz.)                             | Anzahl<br>analy-<br>sier-<br>ter Me-<br>tapha-<br>sen | Achromatische<br>Läsionen |               | Chromatiden-<br>brüche |               | Isochroma-<br>tidenbrüche |               | Chromatiden-<br>translokatio-<br>nen |               | Brucher-<br>eignisse<br>pro<br>Zelle |
|----------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------|---------------|------------------------|---------------|---------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------------------|
|          |                                                |                                                       | AL                        | pro           | B'                     | pro           | B''                       | pro           | RB'                                  | pro           |                                      |
|          |                                                |                                                       |                           | Zelle Mitosen | Zelle Mitosen          | Zelle Mitosen | Zelle Mitosen             | Zelle Mitosen | Zelle Mitosen                        | Zelle Mitosen |                                      |
| BU       | BUDR ( $10^{-5}M$ )                            | 100                                                   | 0,040                     | 3,00          | 0,020                  | 2,00          | 0,010                     | 1,00          | 0,000                                | 0,00          | 0,040                                |
| FU Tren. | BUDR ( $10^{-5}M$ )<br>Trenimon ( $10^{-8}M$ ) | 100                                                   | 0,050                     | 5,00          | 0,040                  | 4,00          | 0,040                     | 4,00          | 0,010                                | 1,00          | 0,140                                |

Tabelle 27. Häufigkeiten von Chromosomenaberrationen (Achromatische Läsionen: AL, Chromatidenbrüche: B', Isochromatidenbrüche: B'' und Chromatidentranslokationen: RB') und Gesamtzahl der Bruchereignisse pro Zelle (AL entfällt; B' = 1; B'', RB' = 2 Bruchereignisse) nach Bromdesoxyuridin (BUDR)-Behandlung (Serie BU, Experiment 7 B) und nach BUDR- und Trenimonbehandlung (Serie BU Tren., Experiment 7 B), sowie Anzahlen analysierter Metaphasen. Kulturdauer: 72 Std., einschließlich 4 1/2 Std. Colcemidbehandlung. Zugabe von BUDR 24 Std. nach Ansatz, Zugabe von Trenimon 48 Std. nach Ansatz

| Serie     | Behandlung (Konz.)                                                                    | Anzahl analysierter Metaphasen | SCE pro Metaphase |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| BU A      | BUdR ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ )                                                | 50                             | 4,14              |
| BU B      | BUdR ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ )                                                | 50                             | 4,06              |
| BU A+B    |                                                                                       | 100                            | 4,10              |
| BU Na A   | BUdR ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ )<br>Na Acetat ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ ) | 50                             | 4,98              |
| BU Na B   | BUdR ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ )<br>Na Acetat ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ ) | 50                             | 4,16              |
| BU Na A+B |                                                                                       | 100                            | 4,57              |
| BU Pb A   | BUdR ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ )<br>Pb Acetat ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ ) | 50                             | 4,80              |
| BU Pb B   | BUdR ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ )<br>Pb Acetat ( $10^{-5}\underline{\text{M}}$ ) | 50                             | 4,42              |
| BU Pb A+B |                                                                                       | 100                            | 4,61              |

Tabelle 28. Häufigkeiten von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) pro Metaphaseplatte nach Bromdesoxyuridin (BUdR)-Behandlung (Serie BU, Experiment 7 C), nach BUdR- und Natriumacetatbehandlung (Serie BU Na, Experiment 7 C) und nach BUdR- und Bleiacetatbehandlung (Serie BU Pb, Experiment 7 C), sowie Anzahlen analysierter Metaphasen. A, B: Parallelserien. Kulturdauer: 72 Std., einschließlich 4 1/2 Std. Colcemidbehandlung. Zugabe von BUdR 24 Std., von Natriumacetat bzw. Bleiacetat 48 Std. nach Ansatz

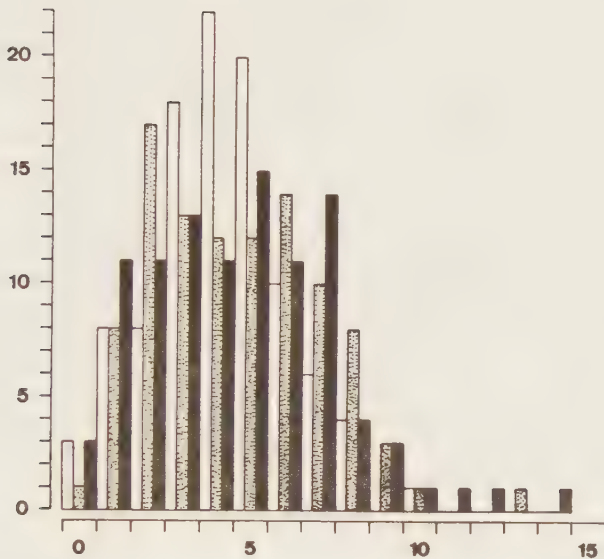


Abbildung 18. Häufigkeiten von Metaphasen (Ordinate) mit unterschiedlichen Anzahlen von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) (Abszisse) nach Bromdesoxyuridin (BUdR)-Behandlung (Helle Säulen; Serie BU, Experiment 7 C), nach BUdR- und Natriumacetatbehandlung (Gepunktete Säulen; Serie BU Na, Experiment 7 C), sowie nach BUdR- und Bleiacetatbehandlung (Dunkle Säulen; Serie BU Pb, Experiment 7 C). Kulturdauer: 72 Std., einschließlich 4 1/2 Std. Colcemidbehandlung. Zugabe von BUdR (Endkonzentration:  $10^{-5}\underline{\text{M}}$ ) 24 Std. nach Ansatz, Zugabe von Natriumacetat (Endkonzentration:  $10^{-5}\underline{\text{M}}$ ), bzw. Bleiacetat (Endkonzentration:  $10^{-5}\underline{\text{M}}$ ) 48 Std. nach Ansatz. Zusammengefaßte Werte zweier Parallelserien (A und B, Tabelle 28)

| Serie | Behandlung (Konz.)       | Anzahl ana-<br>lysierter<br>Metaphasen | Achromatische<br>Läsionen |              | Chromatiden-<br>brüche |       | Isochroma-<br>tidenbrüche |       | Brucher-<br>eignisse<br>pro Zelle |                |
|-------|--------------------------|----------------------------------------|---------------------------|--------------|------------------------|-------|---------------------------|-------|-----------------------------------|----------------|
|       |                          |                                        | AL                        | pro<br>Zelle | pro<br>Mitosen         | Zelle | pro<br>Mitosen            | Zelle |                                   | pro<br>Mitosen |
|       |                          |                                        |                           |              |                        |       |                           |       |                                   |                |
| KO    | unbehandelt              | 200                                    | 0,035                     | 3,00         | 0,010                  | 1,00  | 0,015                     | 1,50  | 0,040                             |                |
| BU    | BUDr ( $10^{-5}M$ )      | 200                                    | 0,045                     | 3,50         | 0,005                  | 0,50  | 0,010                     | 1,00  | 0,025                             |                |
| BU Na | BUDr ( $10^{-5}M$ )      | 200                                    | 0,025                     | 2,50         | 0,020                  | 2,00  | 0,015                     | 1,50  | 0,050                             |                |
|       | Na Acetat ( $10^{-5}M$ ) |                                        |                           |              |                        |       |                           |       |                                   |                |
| BU Pb | BUDr ( $10^{-5}M$ )      | 200                                    | 0,065                     | 5,00         | 0,010                  | 1,00  | 0,000                     | 0,00  | 0,010                             |                |
|       | Pb Acetat ( $10^{-5}M$ ) |                                        |                           |              |                        |       |                           |       |                                   |                |

Tabelle 29. Häufigkeiten von Chromosomenaberrationen (Achromatische Läsionen: AL, Chromatidenbrüche: B' und Isochromatidenbrüche: B'') und Gesamtzahl der Bruchereignisse pro Zelle (AL entfällt; B' = 1, B'' = 2 Bruchereignisse) in unbehandelten Kontrollen (KO), nach Bromdesoxyuridin (BUDr)-Behandlung (Serie BU, Experiment 7 C), nach BUDr- und Natriumacetatbehandlung (Serie BU Na, Experiment 7 C) und nach BUDr- und Bleiacetatbehandlung (Serie BU Pb, Experiment 7 C), sowie Anzahlen analysierter Metaphasen. Kulturdauer: 72 Std., einschließlich 4 1/2 Std. Colcemidbehandlung. Zugabe von BUDr 24 Std., von Natriumacetat bzw. Bleiacetat 48 Std. nach Ansatz

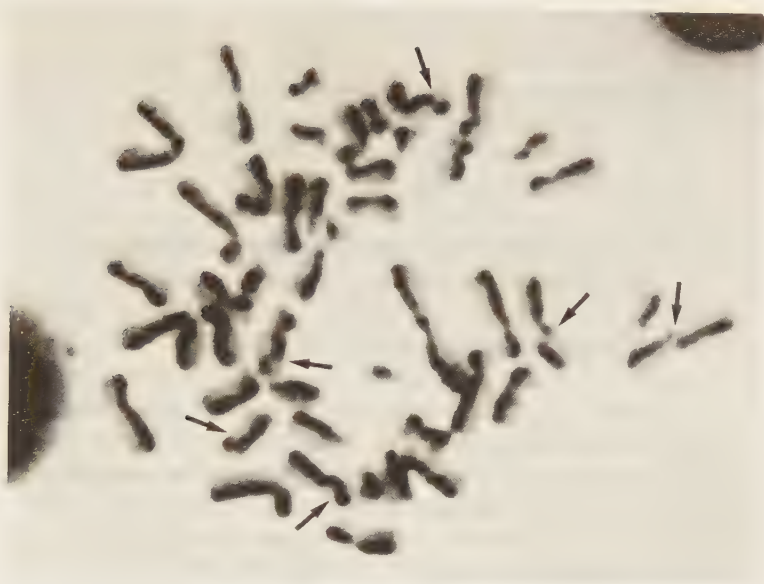


Abbildung XIX. Differenzierung von Schwesterchromatiden durch Inkorporation von Bromdesoxyuridin (BUdR) für die Dauer zweier S-Phasen. Entsprechend der semikonservativen Verteilung neusynthetisierter DNS liegt in allen Chromosomen in der einen Chromatide eine DNS vor, bei der in beiden Einzelsträngen Thymin durch BUdR ersetzt wurde (schwach anfärbbare Chromatide), während in der anderen Chromatide Thymin nur in einem der beiden Einzelstränge der DNS durch BUdR ersetzt werden konnte (stark anfärbbare Chromatide).

Die differenzielle Anfärbbarkeit der beiden Chromatiden aller Chromosomen ist der Nachweis dafür, daß die entsprechende Mitose die zweite Mitose nach BUdR-Zugabe darstellt. Durch eine derartige Differenzierung von Schwesterchromatiden ist eine Analyse der ansonsten unsichtbaren Schwesterchromatidenaustausche (SCE) möglich. Die hier dargestellte Metaphase enthält sechs SCE (Pfeile)

#### IV. Diskussion

##### IV. 1) Subpopulationen in menschlichen Leukozyten- kulturen

##### Proliferation von Subpopulationen in vitro

Teilungsaktive Zellen durchlaufen charakteristische Zellzyklusstadien, in deren Verlauf die Voraussetzungen für eine geregelte Kern- und Zellteilung erfüllt werden (siehe MITCHISON, 1971). Hierzu gehört als wesentlicher Bestandteil die identische Reduplikation des genetischen Materials, die in einem definierten, zumeist mittleren Zeitraum während der Interphase des Zellzyklus, der S- ("Synthese") Phase, erfolgt. Daneben können eine präsynthetische  $G_1$ - ("Gap") und eine postsynthetische  $G_2$ -Phase innerhalb der Interphase unterschieden werden. Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, daß bei Säugerzellen in vitro (einschließlich Zellen des Menschen) in der Regel die  $G_1$ -Phase 8-10 Std., die S-Phase 6-8 Std. und die  $G_2$ -Phase 3-5 Std. dauert. Die Mitose läuft meist innerhalb einer Stunde ab. Während die Dauer der  $G_1$ -Phase, und gelegentlich auch der  $G_2$ -Phase, eine erhebliche Variabilität aufweisen kann, ist die Dauer der S-Phase eines bestimmten Zellsystems weitgehend konstant (siehe MITCHISON, 1971).

Obwohl PHA-stimulierte menschliche Leukozyten in Kultur als zunächst weitgehend synchrones Zellsystem gelten, ist schon seit längerem bekannt, daß eine deutliche Variabilität im Hinblick auf den Beginn der S-Phase und, wahrscheinlich als Folge davon, den Beginn der Mitose verschiedener Zellen vorhanden ist (JASINSKA

et al., 1970; SÖREN, 1973). Als Ursache dafür kann eine unterschiedliche Dauer der ersten  $G_1$ -Phase verschiedener Zellen nach PHA-Stimulierung angenommen werden (siehe LING und KAY, 1975). Zahlreiche Autoren vermuten, daß der genannten Variabilität zumindest zwei Untergruppen oder "Subpopulationen" von Zellen zugrunde liegen (DUDIN et al., 1974; JASINSKA et al., 1970; JOHANSEN, 1972; MICHALOWSKI, 1963; STEFFEN und STOLZMANN, 1969), die sich zunächst in ihrer Stimulierungsreaktion nach PHA-Zugabe unterscheiden könnten. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Untergruppen von T-Lymphozyten (siehe LEVIS und ROBBINS, 1970; LING und KAY, 1975). Die Annahme derartiger Subpopulationen in menschlichen Leukozytenkulturen beruht vor allem auf Untersuchungen des DNS-Synthesemusters und der Mitoseindexbestimmung zu verschiedenen Zeiten nach PHA-Stimulierung. Ein direkter Vergleich der genannten Befunde wird durch die Verwendung unterschiedlicher Kultur- und Untersuchungstechniken zum Teil sehr erschwert. Entgegen der weitverbreiteten Auffassung, daß die Verwendung verschiedener synthetischer Kulturmedien keinen wesentlichen Einfluß auf die Proliferation menschlicher Leukozyten in vitro auszuüben vermag (siehe z.B. ZACKAI und MELLMAN, 1974), kann heute als gesichert gelten, daß verschiedene Kulturmedien zu deutlich unterschiedlichen Stimulierungsreaktionen führen (DUDIN et al., 1974; OBE et al., 1975 a, 1976 b). Nach Stimulierung mit PHA (siehe LING und KAY, 1975), aber auch mit Pokeweed-Mitogen (DUDIN et al., 1976) sind erste Zellen in der S-Phase des Zellzyklus etwa 24 Std. nach Kulturansatz autoradiographisch nachweisbar. Das weitere "DNS-Synthesemuster", d.h. die Häufigkeitsverteilung  $^3\text{H}$ -TdR-markierter Zellen, sowie die Häufigkeiten von Zellen in Mitose zu verschiedenen Kulturzeiten, hängen jedoch in deutlicher Weise vom

verwendeten Kulturmedium und/oder Mitogen ab (vergl. DUDIN et al., 1974, 1976; OBE et al., 1975 a, 1976 b). Zudem könnten hierbei auch andere Faktoren, wie z.B. das Lebensalter des Blutspenders eine Rolle spielen (siehe HATCHER und HOOK, 1976; MEREDITH et al., 1975).

Ausdruck der unterschiedlichen Proliferation menschlicher Leukozyten in verschiedenen Kulturmedien nach PHA-Stimulierung sind die unterschiedlichen Häufigkeiten erster, zweiter und dritter Mitosen nach 72-stündiger Kulturdauer. Mit Hilfe einer BuDR-Markierungsmethode wurden derartige Untersuchungen nach Verwendung von Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) (OBE et al., 1976 b), TC Medium 199 (OBE et al., 1975 a) und Ham's F-10 Kulturmedium in der vorliegenden Arbeit (siehe Experiment III. 7 A) durchgeführt. Die Colcemidbehandlung war in allen drei Fällen gleich:

Erste Mitosen: TC Medium 199 (24%) > Ham's F-10 (20%) > Eagle's MEM (7%).

Zweite Mitosen: Ham's F-10 (57%) > Eagle's MEM (52%) > TC Medium 199 (46%).

Dritte Mitosen: Eagle's MEM (41%) > TC Medium 199 (30%) > Ham's F-10 (23%).

Das gleichzeitige Auftreten erster, zweiter und dritter Mitosen nach 72-stündiger Kulturdauer deutet darauf hin, daß die anfängliche Synchronie des Leukozytenkultursystems bereits nach dreitägiger Kulturdauer weitgehend verlorengegangen ist. Aus dem oben dargestellten Vergleich der Häufigkeiten erster, zweiter und dritter Mitosen kann auf eine schnellere Proliferation menschlicher Leukozyten in vitro nach Verwendung von Eagle's MEM im Vergleich zu Ham's F-10 Medium und besonders TC Medium 199 geschlossen werden. Neben der Proliferationsrate ist für die Ver-

wendung menschlicher Leukozytenkulturen als Testsystem für Chromosomenmutationen jedoch das Ausmaß der Synchronie von erheblicher Bedeutung. Hier zeigt ein Vergleich des DNS-Synthesemusters und der Häufigkeitsverteilungen von Mitosen zu verschiedenen Kulturzeiten, daß innerhalb eines Kulturzeitraumes von ca. 2 Tagen in Kulturen unter Verwendung von Ham's F-10 Medium der Synchroniegrad wesentlich höher ist als in Eagle's MEM- oder TC Medium 199 Kulturen (siehe DUDIN et al., 1974; OBE et al., 1975 a, 1976 b). In Ham's F-10 Kulturen treten erste Mitosen zwar später auf als in Eagle's MEM Kulturen, dafür aber in größerer Häufigkeit innerhalb eines geringeren Zeitraumes.

In 2-Tage-Kulturen menschlicher Leukozyten unter Verwendung von Ham's F-10 Kulturmedium kann eine zweigipflige Häufigkeitsverteilung von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus und in der Mitose angenommen werden (DUDIN et al., 1974; SLACIK-ERBEN, 1976): Erste Zellen in der S-Phase sind ca. 26 Std. nach Kulturbeginn autoradiographisch nachweisbar, ein erstes Maximum der Häufigkeit DNS-synthetisierender Zellen 34 Std., ein zweites 40 Std. nach Kulturansatz. Die ersten Mitosen können ca. 36 Std. nach Ansatz gefunden werden. Die Häufigkeitsverteilung der Mitoseindices zwischen 36 und 54 Std. läßt ein erstes Maximum bei 44 Std. und ein zweites bei 48 Std. nach Kulturbeginn erkennen. Die Ergebnisse von Experiment III. 1 dieser Arbeit (DNS-Replikation von Subpopulationen) unterstützen die Annahme zweier Subpopulationen von Zellen in menschlichen Leukozytenkulturen. Ausgehend von der Ansammlung aller bis zu 54 Std. nach Ansatz auftretenden Mitosen mit Colcemid (ausschließlich erste Mitosen nach PHA-Stimulierung) konnte gezeigt werden, daß ca. 50% der Zellen, die von 38-54 Std. nach Kulturbeginn in die

Mitose eintreten, erst nach 36 Std. in Kultur mit der DNS-Synthese beginnen, während sich die verbleibenden 50% nachweislich zwischen 26 und 36 Std. in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Berücksichtigt man als mittlere Dauer der S-Phase einer menschlichen Zelle 6-8 Std. und der  $G_2$ -Phase 3-5 Std. (siehe MITCHISON, 1971), deuten die vorliegenden Befunde auf zwei Subpopulationen von Zellen in Ham's F-10 2-Tage-Kulturen, die nacheinander, jede für sich relativ synchron, in die S-Phase des Zellzyklus und später in die Mitose eintreten.

#### Unterschiedliche Mutagensensitivitäten von Subpopulationen

Ergebnisse von BENDER und BREWEN (1969) sowie STEFFEN und MICHALOWSKI (1973) lieferten ebenfalls Hinweise auf die Existenz zweier Subpopulationen in PHA-stimulierten menschlichen Leukozytenkulturen, die zu unterschiedlichen Zeiten in die Mitose eintreten. Darüberhinaus forderten diese Autoren zur Erklärung der von ihnen erhaltenen heterogenen Aberrationsraten zu verschiedenen Aufarbeitungszeiten unterschiedliche Sensitivitäten von Subpopulationen nach Röntgenbestrahlung. Demgegenüber nehmen jedoch HEDDLE et al. (1967) an, daß unterschiedliche Aberrationsraten zu verschiedenen Kultivierungszeiten nach Röntgenbestrahlung menschlicher Leukozyten lediglich Ausdruck der mitotischen Selektion chromosomal geschädigter Zellen sind (BUCKTON und PIKE, 1964).

Wegen der Bedeutung der Frage unterschiedlich mutagensensitiver Subpopulationen von Zellen in menschlichen Leukozytenkulturen für die Verwendung dieses Testsystems sowohl bei der Mutagenitätsprüfung als auch im Bereich der Grundlagenforschung, sollte in der vorliegenden

Arbeit ein Beitrag zur Klärung dieses Problems erbracht werden. Den methodischen Ansatz zu derartigen Untersuchungen mit dem Ham's F-10 Kultursystem liefert die zeitliche Trennung der S-Phasen der in diesen Kulturen nachweisbaren Subpopulationen, die eine Alternativmarkierung mit  $^3\text{H}$ -TdR in der S-Phase und spätere autoradiographische Identifizierung in der Metaphase gestattet.

Wie die Ergebnisse von Experiment III. 2 (Sensitivitäten von Subpopulationen nach Chemomutagenbehandlung) zeigen, sind nach Aberrationsinduktion mit dem alkylierenden Chemomutagen A 139 und gleichzeitiger  $^3\text{H}$ -TdR-Markierung in Metaphasen der früh replizierenden (ersten) Subpopulation von Zellen dreimal mehr Chromatidentranslokationen nachweisbar als in Metaphasen der spät replizierenden (zweiten) Subpopulation. Durch die gleichzeitige  $^3\text{H}$ -TdR-Markierung beziehen sich diese Angaben in beiden Fällen nur auf nachweislich erste Mitosen nach Aberrationsinduktion. Eine mitotische Selektion als Ursache der genannten Unterschiede in den Häufigkeiten von Chromatidentranslokationen kann daher ausgeschlossen werden.

Es ist bekannt, daß durch Inkorporation von  $^3\text{H}$ -TdR Chromosomenmutationen induziert werden können (BENDER et al., 1962; BREWEN und OLIVIERI, 1966; CLEAVER und THOMAS, 1972; DEWEY et al., 1965). Einige der in diesem Experiment auftretenden Chromatidentranslokationen könnten daher nicht durch die Chemomutagenbehandlung sondern durch die Pulsmarkierung induziert worden sein. In anbetracht der vorliegenden hohen Raten von Chromatidentranslokationen dürften  $^3\text{H}$ -TdR-induzierte Aberrationen jedoch unbedeutend sein. Ein möglicher synergistischer Effekt der beiden Substanzen kann zwar nicht ausgeschlossen werden, spielt jedoch für die

Sensitivitätsunterschiede als solche keine Rolle.

Die genannten Ergebnisse sind der bisher einzige Hinweis auf unterschiedliche Sensitivitäten von Subpopulationen menschlicher Leukozyten nach Chemomutagenbehandlung.

Der methodische Ansatz der autoradiographischen Unterscheidung zwischen "früh"- und "spät"-replizierenden Zellen im Ham's F-10 Kultursystem ermöglichte gleichfalls eine direktere Untersuchung der Sensitivitäten in dieser Weise definierter Subpopulationen von Leukozyten nach Röntgenbestrahlung, als die von BENDER und BREWEN (1969), STEFFEN und MICHALOWSKI (1973) oder auch SANTOS MELLO et al. (1974) vorgenommene (Experiment III. 3). Aus den bereits erwähnten Gründen (siehe S. 35) erschien eine gleichzeitige Röntgenbestrahlung und  $^3\text{H}$ -TdR-Markierung nach PHA-Stimulierung in der jeweiligen S-Phase der beiden Subpopulationen ungünstig. Die in diesem Experiment vorgenommene Bestrahlung von Vollblut kann zudem als Annäherung an in vivo-Bedingungen betrachtet werden.

Im Anschluß an die Röntgenbestrahlung wurden Leukozytenkulturen angesetzt und Zellen, die in den ersten 10 Std. nachweisbarer DNS-Synthese (25-35 Std. nach Kulturbeginn) in diesem Kultursystem (DUDIN et al., 1974) in die S-Phase des Zellzyklus eintreten, mit  $^3\text{H}$ -TdR markiert. Diese durch ihre frühe Replikation definierten Zellen ("erste Subpopulation") sind später in der Metaphase durch die autoradiographische Markierung identifizierbar. Dagegen sind unmarkierte Metaphasen Zellen zuzuordnen, die erst nach 35 Std. in Kultur mit der DNS-Synthese beginnen (spät replizierende Zellen; "zweite Subpopulation"). Die jeweils in

markierten bzw. unmarkierten Metaphasen erhaltenen Aberrationen entsprechen daher den in früh bzw. spät replizierenden Zellen im  $G_0$ -Stadium des Zellzyklus induzierten. Zellzyklusverzögernde Effekte nach Röntgenbestrahlung sind seit langem bekannt (BOOTSMA, 1965; BOOTSMA und LOHMAN, 1968; FROESE, 1966; GERNER et al., 1974; HOWARD und PELC, 1953; LEEPER et al., 1972, 1973; MILLER et al., 1973; TERASIMA und TOLMACH, 1963<sup>6</sup>; WALTERS und PETERSEN, 1968; WALTERS und TOBEY, 1970). Sie können bei diesem Versuchsansatz dazu führen, daß normalerweise früh replizierende Zellen nicht mehr im Zeitraum der Pulsmarkierung mit  $^3\text{H}$ -TdR in die S-Phase eintreten und durch die Nichtmarkierung fälschlich den spät replizierenden Zellen zugeordnet werden. Um eine derartige Verzögerung möglichst gering zu halten, wurde eine relativ niedrige Röntgenstrahlendosis (200 R) verwendet. Die Konsequenz für die Beurteilung der in diesem Experiment erhaltenen Versuchsergebnisse werden weiter unten diskutiert.

Über die Röntgenstrahlen-induzierte Zellzyklusverzögerung hinaus ist außerdem eine weitere Verzögerung, etwa durch die Pulsmarkierung, durch Zentrifugation und auch durch den Mediumwechsel nicht auszuschließen, obwohl in diesem wie auch im vorangegangenen Experiment (III. 2) konditioniertes Austauschmedium verwendet wurde. Eine durch  $^3\text{H}$ -TdR-Inkorporation bedingte Zellzyklusverzögerung nehmen z.B. BENDER und BREWEN (1969) an. Aus diesem Grund wurden bis zu 72 Std. nach Kulturansatz alle auftretenden Mitosen in aneinandergrenzenden Intervallen mit Colcemid angesammelt.

Erste Mitosen wurden in diesem Experiment erst nach 50-stündiger Kulturdauer gefunden. Berücksichtigt man den Zeitpunkt der Colcemidzugabe (44 Std.), ergibt sich, verglichen mit dem Auftreten erster Mitosen in unbehandelten Kulturen (36 Std. nach Ansatz; DUDIN et al., 1974), eine Zellzyklusverzögerung von 8-14 Std. In

diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse der autoradiographischen Analyse der Mitosen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeiten von Interesse: Nahezu 100% der nach 50-stündiger Kulturdauer gefundenen Mitosen erwiesen sich als markiert. Bis zu 72 Std. nach Kulturansatz nehmen die Häufigkeiten markierter Mitosen kontinuierlich bis auf ca. 40% ab. Durch eine Verzögerung des Beginns der S-Phase um 10 Std. wäre bei der gegebenen Pulsmarkierung eine Inkorporation von  $^3\text{H}$ -TdR auszuschließen, markierte Mitosen wären nicht nachweisbar. Die vorliegenden hohen Markierungsraten bei starker Verzögerung des Zellzyklus insgesamt deuten darauf hin, daß sich die Verzögerung zumindest nicht ausschließlich, wahrscheinlich sogar kaum bereits im  $G_1$ -Stadium manifestiert. Möglicherweise ist der Hauptanteil der Zellzyklusverzögerung daher nicht auf die Röntgenbestrahlung im  $G_0$ -Stadium, sondern auf die Pulsmarkierung und/oder die damit verbundenen Störungen des Zellsystems zurückzuführen. Mitoseindexbestimmungen nach Röntgenbestrahlung in  $G_0$  ohne weitere Behandlungen könnten darüber Aufschluß geben.

Die Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen, die hier den Hauptanteil an Aberrationen darstellen und im Vordergrund der Betrachtung stehen, lagen zu allen Aufarbeitungszeiten in markierten Mitosen über den in unmarkierten Mitosen erhaltenen Werten. Zellen der ersten Subpopulation erweisen sich damit auch nach Röntgenbestrahlung im  $G_0$ -Stadium, in einem physiologisch weitgehend homogenen Zustand, als strahlensensitiver, verglichen mit Zellen der zweiten Subpopulation. Es ist unwahrscheinlich, daß dieses Ergebnis durch die  $^3\text{H}$ -TdR-Markierung der ersten Subpopulation hervorgerufen wird: Durch  $^3\text{H}$ -TdR-Inkorporation induzierte Chromosomenmutationen treten in der darauffolgenden Mitose als Chroma-

tidenaberrationen zutage. Chromatidenaberrationen, insbesondere Chromatidentranslokationen, wurden jedoch auch in stark markierten Mitosen in keinem Fall gefunden. Zudem dürften zum Zeitpunkt der  $^3\text{H}$ -TdR-Zugabe die zur Bildung Dizentrischer Chromosomen führenden Reunionsvorgänge bereits ihren Abschluß gefunden haben (DEWEY und HUMPHREY, 1964; PREMPREE und MERZ, 1969; WOLFF, 1960, 1972; WOLFF und ATWOOD, 1954; WOLFF und LUIPPOLD, 1955).

Die Unterschiede in den Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen zwischen Zellen der ersten und zweiten Subpopulation können nicht das Ergebnis einer durch Zellzyklusverzögerung bedingten Nichtmarkierung von Zellen der ersten Subpopulation sein. Dies müßte im umgekehrten Fall, bei höherer Sensitivität der zweiten, spät replizierenden Subpopulation berücksichtigt werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen könnte jedoch höchstens eine Verringerung der Differenz in den Aberrationsraten zwischen markierten und unmarkierten Metaphasen die Folge einer Zellzyklusverzögerung (und damit Nichtmarkierung einiger Zellen der ersten, früh replizierenden Subpopulation) sein. Im Mittel erwies sich die erste Subpopulation in diesem Experiment als annähernd doppelt so sensitiv wie die zweite, gemessen an den Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen. Nach Chememutagenbehandlung (Experiment III. 2) konnte eine dreifach höhere Sensitivität der ersten gegenüber der zweiten Subpopulation festgestellt werden, in diesem Fall bezogen auf die Häufigkeiten von Chromatidentranslokationen. Obwohl eine Reihe grundlegender Unterschiede zwischen den beiden Experimenten bedacht werden müssen, könnte eine durch Zellzyklusverzögerung bedingte Nichtmarkierung von Zellen der sensitiveren ersten Subpopulation, die damit der zweiten zugerechnet würden, zu einer Verringerung der erhaltenen Sensitivitätsdifferenzen führen. Demnach kann nicht ausgeschlossen

werden, daß Zellen der zweiten Subpopulation eine weit geringere Sensitivität gegenüber Röntgenbestrahlung aufweisen, als die hier erhaltenen Werte vermuten lassen.

Könnten die vorliegenden Unterschiede in den Häufigkeiten strahleninduzierter Aberrationen zwischen früh und spät replizierenden Zellen durch andere Mechanismen, als durch unterschiedliche Mutagensensitivität verursacht sein?

In einem teilungsaktiven Gewebe, und als Modell eines solchen ist die Leukozytenkultur anzusehen, können bei homogener Sensitivität unterschiedliche Aberrationsraten zu verschiedenen Zeiten nach Mutationsinduktion einmal durch unterschiedliche Zellzyklusverzögerung (siehe z.B. STEFFEN und MICHALOWSKI, 1973), zum anderen durch mitotische Selektion chromosomal geschädigter Zellen (BUCKTON und PIKE, 1964) verursacht sein. Im ersten Fall wird angenommen, eine mit dem Ausmaß der chromosomalen Schädigung der jeweiligen Zelle korrelierende Zellzyklusverzögerung führe innerhalb der Gruppe erster Mitosen nach Aberrationsinduktion dazu, daß in früher auftauchenden ersten Mitosen geringere Aberrationsraten festzustellen sind, als in später auftretenden. Bei insgesamt hohen Aberrationsraten kann dies insbesondere durch eine Erhöhung der Anzahl von Aberrationen pro Zelle hervorgerufen sein. Ein derartiger Mechanismus müßte bedacht werden, wenn lediglich anhand hoher Aberrationsraten zu späteren Aufarbeitungszeiten eine höhere Sensitivität einer fiktiven, spät in die Mitose eintretenden Subpopulation postuliert werden sollte, kann hier aber außer acht bleiben. Interessant ist in diesem Zusammenhang jedoch, daß im vorliegenden Experiment bei einer zeit-

lichen Trennung von immerhin 12 Std. keineswegs eine Zunahme der Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen mit fortschreitender Kulturdauer in nachweislich ersten Mitosen nach Aberrationsinduktion festzustellen ist. In der Gruppe der stark markierten (ersten) Mitosen fanden sich vielmehr die höchsten Aberrationsraten zum frühestmöglichen Aufarbeitungszeitpunkt.

Von größerem Gewicht für die Deutung der hier erhaltenen Versuchsergebnisse ist die Frage, ob mitotische Selektion für die Unterschiede in den Aberrationsraten zwischen früh und spät replizierenden Zellen verantwortlich sein könnte. Das auf der Basis der Ergebnisse dieses Experiments abgeleitete Postulat einer strahlensensitiveren ersten Subpopulation von Leukozyten beruht im Gegensatz zu den Arbeiten von BENDER und BREWEN (1969), sowie STEFFEN und MICHALOWSKI (1973) nicht lediglich auf dem Vergleich der Aberrationsraten zu verschiedenen Aufarbeitungszeiten. Kernpunkt unserer Argumentation ist der Vergleich der Aberrationsraten in markierten und unmarkierten Metaphasen, der Aufarbeitungszeitpunkt spielt zunächst eine untergeordnete Rolle. Ein durch mitotische Selektion hervorgerufenen Absinken der Aberrationsraten mit fortschreitender Kulturdauer müßte ein Auftreten zweiter oder sogar weiterer Mitosen nach Aberrationsinduktion zur Ursache haben. Wie die bereits erwähnten Ergebnisse von Experiment III. 7 A zeigten, sind nach 72-stündiger Kulturdauer erste, zweite und dritte Mitosen in Ham's F-10 Kulturen nebeneinander nachweisbar, wobei die zweiten Mitosen in der Überzahl sind. Berücksichtigt man die bereits diskutierte Zellzyklusverzögerung von 8-14 Std., kann angenommen werden, daß selbst nach 72-stündiger Kulturdauer im vorliegenden Experiment erste Mitosen nach

Aberrationsinduktion überwiegend, wenn nicht ausschließlich vorhanden sind. Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht, daß in allen analysierten Metaphasen die Austauschaberrationen stets mit Fragmenten assoziiert auftraten, keine polyploiden Mitosen (siehe BENDER und BREWEN, 1969; HEDDLE et al., 1967) und, trotz zunehmender Häufigkeiten von Mikrokernen mit fortschreitender Kulturdauer kein "Mikrokern-PCC" beobachtet wurde (siehe OBE et al., 1975 b, 1976 a). Darüber hinaus war, trotz autoradiographischer Markierung im frühestmöglichen Kulturzeitraum, keine zweite Mitose nach Pulsmarkierung autoradiographisch nachweisbar (siehe TAYLOR et al., 1957).

Wie die Häufigkeitsverteilungen markierter und unmarkierter Mitosen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeiten zeigen, tritt die Hauptmasse der früh replizierenden (markierten) Zellen auch vor den spät replizierenden (unmarkierten) in die Mitose ein, was zu erwarten war. Eine mitotische Selektion müßte somit eher die Population sich früh teilender Zellen insgesamt in erheblicherem Ausmaß betreffen, als die Population sich spät teilender Zellen. Eine Möglichkeit der Abschätzung des Einflusses mitotischer Selektion auf die Raten Dizentrischer Chromosomen in markierten Metaphasen ergibt sich aus einem Vergleich der Aberrationshäufigkeiten in markierten und stark markierten (ersten) Mitosen. Aus der Gesamtheit der markierten Mitosen konnten stark markierte Mitosen ausgegliedert werden, die aufgrund des Markierungsmusters alle als erste Mitosen nach Pulsmarkierung und damit auch nach Aberrationsinduktion identifiziert werden konnten. Neben der Tatsache, daß die Raten Dizentrischer Chromosomen in nachweislich ersten Mitosen der früh replizierenden Subpopulation von Leukozyten

zu den einzelnen Aufarbeitungszeiten stets über den in unmarkierten Mitosen ermittelten Werten liegen, ist hier die Möglichkeit des Vergleichs der über alle Aufarbeitungszeiten zusammengefaßten Aberrationsraten in markierten und stark markierten (ersten) Mitosen von Bedeutung: Die Gruppe der stark markierten (ersten) Mitosen kann von mitotischer Selektion nicht betroffen sein. Liegt der zusammengefaßte Wert Dizentrischer Chromosomen in markierten Mitosen deutlich unter dem in stark markierten (ersten) Mitosen, kann mitotische Selektion als Ursache angenommen werden. Wie der Vergleich zeigt (markierte Mitosen: 0,195 pro Zelle; stark markierte Mitosen: 0,196), sind die Werte in beiden Beurteilungsklassen nahezu identisch.

In Erwägung aller beschriebenen Erklärungsmöglichkeiten scheinen demnach nur unterschiedliche Sensitivitäten von Subpopulationen menschlicher Leukozyten als Ursache der vorliegenden Ergebnisse in Frage zu kommen.

Die unterschiedliche Sensitivität von Subpopulationen menschlicher Leukozyten sowohl nach Chemomutagenbehandlung als auch nach Röntgenbestrahlung deutet auf grundlegende, konstitutionsbedingte Ursachen der jeweiligen Mutagensensitivität beider Zellgruppen hin; bei morphologisch weitgehend identischen Zellen ein überraschender Befund. Gerade dieser Umstand könnte lohnender Ansatzpunkt für Untersuchungen der Mechanismen zellulärer Mutagensensitivität bzw. -resistenz sein.

Erklärungsmöglichkeiten für die Ursachen der unterschiedlichen Mutagensensitivität können bisher nur spekulativen Charakter haben. Möglicherweise führen Unterschiede in der physiologischen Konstitution der beiden Zelltypen, die sich zunächst offenbar in unter-

schiedlichen Stimulierungsreaktionen äußern, auch zu verschiedener Effektivität chromosomaler Reparaturmechanismen. Untersuchungen der Häufigkeiten von Schwesterchromatidenaustauschen in beiden Subpopulationen könnten Hinweise auf Unterschiede im Bereich der Reparaturmechanismen liefern (siehe LATT, 1974 b; KATO, 1973, 1974 a).

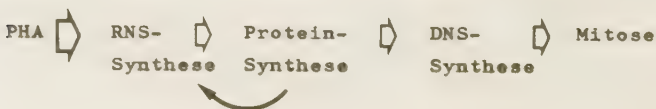
Bei der weiten Verbreitung menschlicher Leukozytenkulturen als Testsystem für Chromosomenmutationen sind unterschiedliche Sensitivitäten von Leukozyten-subpopulationen auch von erheblicher praktischer Bedeutung. Besonders im Hinblick auf eine durch Mutagenbehandlung bedingte Zellzyklusverzögerung, oder auf nicht auszuschließende unterschiedliche Anteile beider Untergruppen von Zellen von Blutentnahme zu Blutentnahme eröffnet sich ein ganzes Spektrum möglicher Effekte, die zu Fehlinterpretationen Anlaß geben könnten. Derartige Schwankungen der Anteile unterschiedlich strahlensensitiver Subpopulationen von Leukozyten nehmen STEFFEN und MICHALOWSKI (1973) zur Erklärung ihrer Versuchsergebnisse an. Inter- und intraindividuelle Schwankungen der Anteile von B- und T-Lymphozyten im menschlichen peripheren Blut sind von einigen Autoren beschrieben worden (AUGENER et al., 1974; DIAZ-JOUANEN et al., 1975; GAJL-PECZALSKA et al., 1974; SMITH et al., 1974; STEEL et al., 1974, 1975). Wie bereits erwähnt, dürfte es sich bei den hier diskutierten unterschiedlich mutagensensitiven Subpopulationen zwar um Untergruppen von T-Lymphozyten handeln (LEVIS und ROBBINS, 1970), deren Anteile könnten jedoch in ähnlicher Weise schwanken. In diesem Zusammenhang wäre u.a. von Interesse, ob auch im Bereich der Spontanraten chromosomaler Mutationen Unterschiede zwischen beiden Leukozytensubpopulationen feststellbar

sind. Wäre dies der Fall, könnten z.B. derartige Fluktuationen den beschriebenen Unterschieden in den Spontanraten von Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und Jahreszeit zugrunde liegen (JACOBS et al., 1961; LITTLEFIELD und GOH, 1973; LUBS und SAMUELSON, 1967; MATTEVI und SALZANO, 1975).

Bei der vorliegenden Komplexität des menschlichen Leukozytentestsystems scheint im Hinblick auf eine Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse verschiedener Laboratorien zumindest eine Standardisierung der Kulturtechniken äußerst wünschenswert, wenn nicht dringend erforderlich zu sein.

#### IV. 2) Das RNS-Synthese-Muster der 2-Tage-Kultur

Zu den frühesten erkennbaren Reaktionen auf die mitogene Stimulierung von Leukozyten durch PHA gehört der Anstieg der RNS-Syntheserate (siehe LING und KAY, 1975). Im Verlauf der Transformation genetisch weitgehend inerter Leukozyten im  $G_0$ -Stadium zu blastenähnlichen Zellen, die ihre Teilungsfähigkeit wiedererlangen, nimmt der zelluläre RNS-Gehalt beträchtlich zu (SÖREN und BIBERFELD, 1973) und im Zytoplasma sind vermehrt Polyribosomen als Ausdruck erhöhter Proteinsynthese biochemisch (AHERN und KAY, 1975) und elektronenmikroskopisch (SÖREN und BIBERFELD, 1973) nachweisbar. Während die in  $G_0$ -Lymphozyten vorhandenen geringen Mengen von RNS-Polymerase I und II nach Zugabe von PHA innerhalb von Minuten aktiviert werden, ist eine weitere Erhöhung der RNS-Syntheserate von der Proteinsynthese, und damit der Neubildung von RNS-Polymerase abhängig (POGO, 1972). Ein lichtmikroskopisch analysierbares Anzeichen der Zunahme der zellphysiologischen Aktivität während der Blastentransformation von Leukozyten liefert die Vermehrung von Nukleolusmaterial (ribosomale RNS) mit fortschreitender Kulturdauer (GANI, 1976). Ähnlich der "De-novo-Synthese" von RNS-Polymerase, hängt im weiteren Verlauf des Zellzyklus die DNS-Replikation, und damit der Beginn der S-Phase von der Neubildung von DNS-Polymerase ab (LOEB et al., 1970). Die zeitliche Abfolge der wesentlichsten im Verlauf der mitogenen Transformation von Leukozyten auftretenden Syntheseleistungen faßt das folgende Schema zusammen:



Aus der Vielzahl weiterer morphologischer, physiologischer und biochemischer Veränderungen denen Leukozyten während des ersten Zellzyklus nach PHA-Stimulierung in vitro unterliegen seien nur wenige, den Zellkern betreffende Beispiele herausgegriffen (Übersicht bei LING und KAY, 1975). Während das Chromatin von Leukozyten im  $G_0$ -Stadium stark kondensiert ("heterochromatisiert") erscheint, ist nach PHA-Stimulierung eine zunehmende Auflockerung ("Euchromatisierung") und Vergrößerung des Zellkerns zu beobachten (BESSIS, 1973; FRENSTER, 1974). Dieser morphologisch erkennbaren "Aktivierung" des Zellkerns entspricht eine Veränderung der Chromatinstruktur bzw. -zusammensetzung im molekularen Bereich: Die chemischen Bindungskräfte zwischen DNS und chromosomalen Proteinen verringern sich (KILLANDER und RIGLER, 1965, 1969; RIGLER und KILLANDER, 1969) und das Muster der chromosomalen Nicht-Histon-Proteine wird verändert (YEOMAN et al., 1976).

Eine Zunahme der RNS-Syntheserate während des Zellzyklus eukaryoter Zellen ist seit langem bekannt (siehe MITCHISON, 1971). Ungeklärt ist jedoch, ob eine kontinuierliche Zunahme während der gesamten Interphase bis zum Beginn der Mitose (ENGER und TOBEY, 1969; GAFFNEY und NARDONE, 1968; KIM und PEREZ, 1965; SCHARFF und ROBBINS, 1965; TERASIMA und TOLMACH, 1963<sup>a</sup>), oder eine besonders drastische Erhöhung der RNS-Syntheserate während der S-Phase des Zellzyklus die Regel ist (CRIPPA, 1966; KLEVECZ und STUBBLEFIELD, 1967; MARTIN et al., 1969). In dieser Arbeit wurde das RNS-Synthesemuster des Ham's F-10 Kultursystems bis zu 53 Std. nach Kulturbeginn autoradiographisch ermittelt. Wie die Häufigkeitsverteilungen  $^3\text{H}$ -UR-markierter Zellen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeiten zeigen, ist ein diskontinuierlicher Anstieg der RNS-Synthese in

diesem Kultursystem während des ersten Zellzyklus nach PHA-Stimulierung anzunehmen: Bis zu 13 Std. nach Kulturbeginn ist eine geringe RNS-Syntheserate nachweisbar. Im weiteren Verlauf der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus (bis zu ca. 24 Std. nach Ansatz; vergl. DUDIN et al., 1974) sind zwei deutlich voneinander getrennte Maxima der Häufigkeiten markierter Interphasekerne bei 14 und 19 Std. zu erkennen. Danach nehmen die Häufigkeiten markierter Interphasekerne bis ca. 70% zu, wobei zwei weitere Maxima bei 33 und 41 Std. nach Ansatz angenommen werden können. In diesem Kultursystem sind zu fast identischen Zeiten (34 und 40 Std.) ebenfalls Maxima der DNS-Syntheseaktivität erkennbar (DUDIN et al., 1974). Dieser Befund unterstützt demnach die Annahme einer besonders starken RNS-Syntheserate während der S-Phase des Zellzyklus.

Es muß an dieser Stelle erwähnt werden, daß neben der RNS-Synthese eine Reihe anderer Faktoren zusätzlich die Inkorporation von <sup>3</sup>H-UR in die Zelle und den Zellkern beeinflussen können (KAY und HANDMAKER, 1970). Vor allem mögliche Schwankungen der intrazellulären Mengen von RNS-Vorstufen sind nicht auszuschließen. Diese und andere Einschränkungen relativieren alle quantitativen Untersuchungen, die zur RNS-Syntheserate während des Zellzyklus auf der Basis der Inkorporation von <sup>3</sup>H-UR vorgenommen wurden, da sie methodisch bisher kaum in ausreichendem Maße berücksichtigt werden können (siehe LING und KAY, 1975; MITCHISON, 1971).

Die vorliegende Untersuchung gestattet keine Aussage über den "RNS-Typ", dessen Synthese den jeweiligen <sup>3</sup>H-UR-Inkorporationsraten zugrunde liegt. Es kann zwar begründet angenommen werden, daß zunächst vor allem die Synthese ribosomaler RNS während der Blastentrans-

formation im Vordergrund steht (siehe LING und KAY, 1975), andererseits könnten jedoch auch "regulative" RNS-Typen ("low molecular weight nuclear RNA") während früher Zeiträume nach PHA-Stimulierung vornehmlich synthetisiert werden. HOWARD (1972) fand ein Maximum der Synthese derartiger "regulativer" RNS 16 Std. nach PHA-Stimulierung menschlicher Leukozyten und nimmt einen Zusammenhang zum Beginn der DNS-Synthese an. In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ähnlichen Zeitraum eine deutliche Erhöhung der Häufigkeiten  $^3\text{H}$ -UR-markierter Zellen festgestellt.

Der zunächst überraschende Befund einer zweigipfligen Verteilung der Häufigkeiten  $^3\text{H}$ -UR-markierter Zellen während der ersten  $G_1$ -Phase nach PHA-Stimulierung in Ham's F-10 Kulturen könnte durch das bereits diskutierte Vorhandensein zweier Subpopulationen von Leukozyten verursacht sein. Besonders die Ähnlichkeit der zeitlichen Differenz zwischen den jeweiligen Maxima ist hierfür ein Indiz: Mitosemaxima: 44 und 48 Std., Differenz = 4 Std.; DNS-Synthesemaxima: 34 und 40 Std., Differenz = 6 Std. (DUDIN et al., 1974); RNS-Synthesemaxima in  $G_1$ : 14 und 19 Std., Differenz = 5 Std. Bei der Empfindlichkeit dieses Kultursystems gegenüber etwa temperaturbedingten Schwankungen der Zellzyklusdauer ist die Übereinstimmung der zeitlichen Differenz zwischen RNS-, DNS- und Mitosemaxima erstaunlich und berechtigt zu der Annahme, das erste RNS-Synthesemaximum in  $G_1$  sei der früh replizierenden Subpopulation von Leukozyten, das zweite der spät replizierenden zuzuordnen.

#### IV. 3) Zusammenfassende Charakterisierung des Ham's F-10 Kultursystems

Auf der Basis der bisher diskutierten Befunde soll im folgenden der Versuch einer zusammenfassenden Charakterisierung des Ham's F-10 Kultursystems unternommen werden. Der mehr oder weniger hypothetische Charakter der jeweiligen Aussage wird hierbei nicht besonders betont.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Komplexität des menschlichen Leukozytentestsystems eine möglichst weitgehende Standardisierung der Kulturbedingungen erforderlich macht, soll eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Laboratorien gewährleistet sein. Es kann davon ausgegangen werden, daß unterschiedlich mutagensensitive Subpopulationen von Leukozyten unabhängig von der Wahl des Kulturmediums und anderer Komponenten des Kurzzeitkultursystems in jedem Fall nach PHA-Stimulierung vorhanden sind. Möglicherweise könnte die Verwendung anderer Mitogene zu einer selektiven Stimulierung einer der beiden Subpopulationen von (wahrscheinlich) T-Lymphozyten wenigstens innerhalb bestimmter Kulturzeiträume führen. Eine andere Möglichkeit bestünde in der selektiven Ausschaltung einer der beiden Subpopulationen etwa durch DNS-Synthesehemmung. Ziel dieser Bemühungen ist in jedem Fall, daß eine möglichst einheitlich mutagensensitive Gruppe von Zellen in Mutationsexperimenten zur Auswertung gelangt. Hier bietet, wenn die Vollblutkultur nach PHA-Stimulierung als effektivstes und am wenigsten aufwendiges Kultursystem beibehalten werden soll, das Ham's F-10 Kulturmedium die meisten Vorteile gegenüber allen anderen bisher untersuchten Medien (vergl. DUDIN et al., 1974; OBE et al., 1975 a, 1976 b). In Ham's F-10 Kulturen treten die beiden Subpopulationen von Leukozyten offenbar jede für sich relativ

synchron in die verschiedenen Zellzyklusstadien ein, und die zeitliche Trennung einzelner Zellzykluscharakteristika, wie DNS-Synthese- und Mitosemaxima, gestattet in gewissem Umfang eine Differenzierung beider Untergruppen von Zellen. So kann z.B. in Mutationsexperimenten davon ausgegangen werden, daß bei Analyse von Metaphasen, die während der ersten 8-10 Std. der Mitoseaktivität in diesem Kultursystem auftreten, wahrscheinlich ausschließlich Mitosen der ersten Subpopulation von Zellen erfaßt werden. Diese Zellen sind gekennzeichnet durch ihr frühes Eintreten in den auto-synthetischen Zellzyklus in vitro.

Definiert man den Zeitpunkt der PHA-Zugabe als Beginn der  $G_1$ -Phase in vitro, unterscheiden sich die beiden Leukozytensubpopulationen der 2-Tage-Kultur zunächst offenbar durch eine verschieden lange  $G_1$ -Phase. Unter der Voraussetzung, daß die Dauer von S-Phase,  $G_2$ -Phase und Mitose beider Subpopulationen gleich ist, treten beide Untergruppen von Zellen mit einem "Gangunterschied" von ca. 5 Std. in die einzelnen Zellzyklusstadien ein. Während eine geringe RNS-Syntheserate bis etwa 13 Std. nach PHA-Stimulierung vorliegt, tritt bei 14 Std. (erste Subpopulation) bzw. 19 Std. (zweite Subpopulation) eine deutliche Erhöhung der RNS-Syntheseaktivität auf, deren Ursache ungeklärt ist. Danach treten die beiden Subpopulationen zeitlich versetzt in die S-Phase des Zellzyklus ein (die erste ca. 25 Std. nach Ansatz), wobei eine gewisse zeitliche Überschneidung der S-Phasen beider Untergruppen von Zellen offenbar durch beginnende Asynchronie anzunehmen ist. Maxima der DNS-Syntheseaktivität finden sich bei 34 Std. (erste Subpopulation) bzw. 40 Std. (zweite Subpopulation). Etwa die Hälfte aller Zellen, die bis zu 54 Std. nach Kulturbeginn in die Mitose eintreten durchlaufen die S-Phase in einem Zeitraum von 26-36 Std., die andere Hälfte von 36-46 Std.

nach Kulturansatz. Die RNS-Syntheserate, gemessen an der Häufigkeit  $^3\text{H}$ -UR-markierter Interphasekerne zu verschiedenen Aufarbeitungszeiten, nimmt währenddessen erheblich zu und ist zu Zeiten erhöhter DNS-Syntheseaktivität ebenfalls besonders hoch. In einem Zeitraum von ca. 36-46 Std. nach PHA-Zugabe treten Zellen der ersten, danach Zellen der zweiten Subpopulation in die Mitose ein. Maxima der Mitoseaktivität finden sich, wiederum zeitlich versetzt, bei 44 Std. (erste Subpopulation) bzw. 48 Std. (zweite Subpopulation).

Die beiden Subpopulationen in Ham's F-10 Kulturen unterscheiden sich neben ihren Stimulierungsreaktionen in ihrer Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlen und einem Chemomutagen, wobei die erste Subpopulation in beiden Fällen sensitiver ist als die zweite. Den unterschiedlichen Stimulierungsreaktionen und Mutagensensitivitäten könnten möglicherweise als gemeinsame Ursache Unterschiede in der physiologischen Konstitution zugrunde liegen.

IV. 4) Strahlensensitivität und Aberrationsspektrum  
verschiedener Zellzyklusstadien

Es ist seit langem bekannt, daß Erscheinungsbild wie Häufigkeit strahleninduzierter Chromosomenmutationen vom Zellzyklusstadium, in dem die Bestrahlung vorgenommen wurde, abhängig sind (BREWEN, 1965; DEWEY et al., 1970; SCOTT und EVANS, 1967; SHEPARD und FERRARI, 1970; WOLFF, 1968). Ausgehend von der gut begründeten Annahme, daß Chromosomen eukaryoter Organismen in der  $G_1$ -Phase des Zellzyklus bzw. die Chromatiden des replizierten Chromosoms jeweils aus nur einer Protein-assoziierten DNS-Doppelhelix aufgebaut sind (siehe BENDER et al., 1973 a, b, 1974; DuPRAW, 1970; NATARAJAN, 1976), können heute alle verschiedenen Aberrationstypen in Bezug zur "funktionellen Einsträngigkeit" bzw. "Zweisträngigkeit" zum Zeitpunkt der Bruchinduktion gesetzt werden. Demnach kann prinzipiell zwischen Chromosomen- und Chromatidenaberrationen unterschieden werden, je nachdem, ob die Aberration am prä- oder post-replikativen Chromosom induziert wurde. Die zunächst scheinbar aus diesem Schema herausfallenden "Subchromatidenaberrationen" (siehe RIEGER und MICHAELIS, 1967) stellen wahrscheinlich einen Spezialfall von Chromatidenaberrationen dar, die am prophasischen Chromosom in Mitose oder Meiose induziert werden können und keineswegs die Existenz von "Subchromatiden" beweisen (KIHLMAN, 1969; KLASTERSKA et al., 1976). Bei Induktion von Chromosomenmutationen mit ionisierenden Strahlen sind daher im wesentlichen nach  $G_1$ -Bestrahlung Chromosomenaberrationen, nach Bestrahlung in der S-Phase Chromosomen- und Chromatidenaberrationen und nach Bestrahlung in  $G_2$  Chromatidenaberrationen zu erwarten.

Die Strahlensensitivität von Säugerzellen, gemessen an den Häufigkeiten von Chromosomenmutationen, ist nach

Ergebnissen von BREWEN (1962) und HSU et al. (1962) im  $G_2$ -Stadium des Zellzyklus etwa viermal höher als in  $G_1$ , während in der S-Phase eine mittlere Sensitivität feststellbar ist (SHEPARD und FERRARI, 1970). Demgegenüber fand BREWEN (1965), daß Austauschaberrationen nach Röntgenbestrahlung menschlicher Leukozyten in  $G_1$  weitaus häufiger auftraten, als nach Bestrahlung in der S- oder  $G_2$ -Phase. Die S-Phase erwies sich hierbei als besonders strahlenresistent (Austauschaberrationen in relativen Einheiten etwa:  $G_1 = 17$ ,  $S = 1$ ,  $G_2 = 5$ ). Dieser Befund konnte von SHEPARD und FERRARI (1970) und CARRANO (1975) im wesentlichen bestätigt werden. Den genannten Arbeiten ist jedoch gemeinsam, daß nur relativ wenige verschiedene Bestrahlungszeiten gewählt wurden, die nur recht cursorisch als repräsentativ für "die"  $G_1$ -, S- oder  $G_2$ -Phase menschlicher Leukozyten in vitro gelten können.

Neben den Strahlensensitivitäten verschiedener Zellzyklusstadien ist jedoch von Interesse, inwiefern innerhalb einzelner Zellzyklusstadien unterschiedliche chromosomale Strahlensensitivitäten feststellbar sind. Hier bietet sich insbesondere die extrem lange  $G_1$ -Phase menschlicher Leukozyten nach PHA-Stimulierung in vitro zur Untersuchung an. Es gibt bereits Hinweise auf eine höhere Strahlensensitivität (CARRANO, 1975; HOLMBERG, 1970; WOLFF, 1972) und auch Chemomutagensensitivität (OBARA, 1974; OBE et al., 1976 a) stimulierter menschlicher Leukozyten, im Vergleich zu unstimulierten. Demgegenüber fand EVANS (1967) jedoch sowohl nach Bestrahlung menschlicher Leukozyten im  $G_0$ -Stadium als auch zu verschiedenen Zeiten innerhalb der ersten  $G_1$ -Phase nach PHA-Stimulierung stets ähnliche Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen. Unterschiedliche Mutagensensitivitäten von Subpopulationen menschlicher Leukozyten, Zell-

zyklusverzögerungen nach Röntgenbestrahlung, sowie die Verwendung verschiedener Kultursysteme könnten Ursache dieser Diskrepanz sein. In Experiment III. 5 der vorliegenden Arbeit sollte daher in Ausnutzung der relativ genauen Kenntnis des Ham's F-10 Kultursystems Strahlensensitivität und Aberrationsspektrum verschiedener Zellzyklusstadien menschlicher Leukozyten in vitro untersucht werden. Das Schwergewicht liegt bei der Untersuchung der  $G_0/G_1$ -Phase. Durch die Festlegung des Aufarbeitungszeitpunktes auf 45 Std. nach Ansatz (Colcemidzugabe: 35 Std.) kann davon ausgegangen werden, daß ausschließlich Zellen der ersten Subpopulation in dieser Analyse zur Auswertung gelangen. Unterschiedliche Mutagensensitivitäten von Subpopulationen im Verein mit Zellzyklusverzögerungen können damit als Ursache der erhaltenen Ergebnisse von vornherein ausgeschlossen werden. Formal umfaßt der Versuchsansatz den gesamten ersten Zellzyklus nach PHA-Stimulierung früh replizierender Leukozyten in vitro: zunächst das  $G_0$ -Stadium (Zellen vor PHA-Stimulierung), danach die  $G_1$ -Phase (bis zum Beginn der DNS-Synthese, 25 Std. nach Ansatz), S-Phase und  $G_2$ -Phase, die mit dem Auftreten der ersten Mitosen in diesem Kultursystem (35 Std. nach Ansatz) als beendet angesehen werden kann. Die bereits in diesem Kulturzeitraum auftretende relative Asynchronie gestattet jedoch keine scharfe Trennung der einzelnen Zellzyklusstadien, insbesondere am Übergang von S- zu  $G_2$ -Phase. Wie weiter unten diskutiert, muß darüberhinaus angenommen werden, daß die erhaltenen Ergebnisse nur in Relation zum  $G_0$ -Stadium, zur  $G_1$ -Phase und zur mehr oder weniger vollständigen S-Phase früh replizierender Leukozyten gesetzt werden können.

### Bestrahlung während der $G_0/G_1$ -Phase

Wie die Ergebnisse von Experiment III. 5 zeigen, sind die Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen nach Röntgenbestrahlung menschlicher Leukozyten in der  $G_0/G_1$ -Phase in erheblicher Weise vom Zeitpunkt der Bestrahlung nach Kulturbeginn abhängig. Die relativ geringen Raten von Ringchromosomen und Fragmenten gestatten keine so deutliche Aussage für diese Aberrationstypen. Die Häufigkeiten der Ringchromosomen folgen jedoch offenbar dem gleichen Trend wie die Dizentrischen Chromosomen. Aufgrund der allgemein niedrigen Raten von Fragmenten kann eine Komplementarität in dem Sinne, daß bei hohen Raten von Austauschaberrationen entsprechend niedrige Raten offener Aberrationen auftreten bzw. umgekehrt, ausgeschlossen werden. Eine gewisse "Gegenläufigkeit" der Häufigkeitsverteilungen von Fragmenten und Ringchromosomen zu den verschiedenen Bestrahlungszeiten dürfte eher darauf zurückzuführen sein, daß kleine Ringchromosomen und Fragmente leicht miteinander verwechselt werden können. Zudem sei daran erinnert, daß Fragmente und Isochromatidenbrüche vom Erscheinungsbild her nicht unterscheidbar sind. Für die weitere Diskussion dieses Experiments spielen daher die Isochromatidenbrüche/Fragmente keine Rolle.

Innerhalb der  $G_0/G_1$ -Phase (0-25 Std.) treten nach Bestrahlung in einem mittleren Zeitraum (14-16 Std.) etwa doppelt so viel Dizentrische Chromosomen auf, wie nach Bestrahlung in  $G_0$  oder gegen Ende der  $G_1$ -Phase. Damit bestätigt sich der Befund einer höheren Strahlensensitivität stimulierter menschlicher Leukozyten, verglichen mit unstimulierten (CARRANO, 1975; HOLMBERG, 1976; WOLFF, 1972), wenn die Bestrahlung in einem mittleren Zeitraum der  $G_1$ -Phase erfolgte. Eine später vorgenommene Bestrahlung, zumindest in diesem Kultursystem,

führt erneut zu niedrigeren Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen. Insgesamt ergibt sich demnach folgendes Bild der Strahlensensitivität der ersten  $G_1$ -Phase menschlicher Leukozyten in vitro nach Stimulierung mit PHA: Gemessen an den Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen steigt die Sensitivität relativ kontinuierlich an, erreicht ein Maximum bei 14-16 Std. nach Kulturbeginn und sinkt gegen Ende der  $G_1$ -Phase (19-25 Std.) auf einen Wert ab, der noch unter dem nach Bestrahlung in  $G_0$  erhaltenen liegt.

Eine mögliche Erklärung für derartige Unterschiede der Häufigkeiten Dizentrischer Chromosomen könnten unterschiedliche Konzentrationen von "Reparaturenzymen" sein, die die Bildung von Austauschaberrationen bewirken. Ergebnisse von SPIEGLER und NORMAN (1969) deuten auf eine Erhöhung der Konzentration von Enzymen, die an der DNS-Reparatur nach Röntgenbestrahlung beteiligt sind, nach PHA-Stimulierung menschlicher Leukozyten hin. Nimmt man jedoch an, daß dieselben Enzyme Restitution wie Reunion vermitteln, erscheint ein derartiges "Reparaturenzymmodell" in anbetracht der gleichförmig niedrigen Häufigkeiten offener Aberrationen (s.o.) zur Erklärung der hier erhaltenen Ergebnisse unzureichend.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit könnte darin liegen, daß zu verschiedenen Zeiten innerhalb der  $G_0/G_1$ -Phase unterschiedliche Häufigkeiten von Primärläsionen (nach BENDER et al., 1974: DNS-Doppelstrangbrüche, "scissions") durch Röntgenstrahlen induziert werden. Nach Befunden von LETT und SUN (1970) ist dies jedoch unwahrscheinlich: Nach Röntgenbestrahlung von Zellen des Chinesischen Hamsters wurde keine Zellzyklusabhängigkeit der Häufigkeiten von DNS-Strangbrüchen festgestellt.

Möglicherweise stehen die unterschiedlichen Raten Dizentrischer Chromosomen nach Bestrahlung zu verschiedenen Zeiten innerhalb der ersten  $G_1$ -Phase nach PHA-Stimulierung in Zusammenhang mit den zahlreichen morphologischen, physiologischen und biochemischen Veränderungen, denen Leukozyten während der Blastentransformation unterliegen (vergl. Diskussion IV. 2). Auffällig ist, daß die höchsten Raten Dizentrischer Chromosomen nach Bestrahlung in einem Zeitraum, in dem eine erhöhte RNS-Syntheseaktivität in der ersten  $G_1$ -Phase nach PHA-Stimulierung nachweisbar ist, auftreten (siehe III. 2 und IV. 2). Während ein direkter Zusammenhang zur RNS-Syntheseaktivität unwahrscheinlich sein dürfte, könnte letztere jedoch Ausdruck oder Konsequenz von Veränderungen des intranukleären Milieus während der  $G_1$ -Phase sein, die auch die Bildung von Austauschaberrationen zu beeinflussen vermögen.

AHNSTRÖM und NATARAJAN (1971) fanden einen kontinuierlichen Anstieg der Sensitivität keimender Gerstensamen während der  $G_1$ -Phase des Zellzyklus nach Gammabestrahlung, der mit einer Zunahme der Häufigkeiten chromosomaler Austauschaberrationen (Dizentrische und Ringchromosomen) einherging. Die Autoren kamen zu folgender Annahme: "... the main sensitivity increase during germination is due to increasing interaction possibilities between lesions" (AHNSTRÖM und NATARAJAN, 1971). Ein ähnliches, "mechanistisches" Modell zur Erklärung der unterschiedlichen Strahlensensitivitäten der Oozyten verschiedener Säugetiere wurde von BAKER (1971) vorgeschlagen.

Möglicherweise sind die unterschiedlichen Raten Dizentrischer Chromosomen nach Bestrahlung menschlicher Leukozyten zu verschiedenen Zeiten innerhalb der  $G_0/G_1$ -Phase gleichfalls das Ergebnis unterschiedlicher räumlicher

Beziehungen der Chromosomen zueinander: Im kompakten, hochkondensierten Chromatin des Zellkerns im  $G_0$ -Stadium dürfte bei der vorliegenden geringen metabolen Aktivität die Interaktionswahrscheinlichkeit induzierter Brüche oder "Primärläsionen" relativ gering, und damit die Restitution zur Vorbruchkonfiguration begünstigt sein. Eine Auflockerung oder Umordnung des Chromatins während der PHA-induzierten Blastentransformation könnte die Interaktionswahrscheinlichkeit erhöhen, insbesondere bei gleichzeitig verstärkter metaboler Aktivität und höherem Stoffaustausch innerhalb des Zellkerns und zwischen Zellkern und Zytoplasma.

Wie die weiteren Ergebnisse dieses Experiments zeigen, sind nach Bestrahlung menschlicher Leukozyten im  $G_0/G_1$ -Stadium auch die Häufigkeiten von Chromatidenaberrationen (Chromatidenbrüche und -translokationen) gegenüber unbestrahlten Kontrollen erhöht. Dieser Befund ist wegen der funktionellen Einsträngigkeit präreplikativer Chromosomen formal nicht zu erwarten, bestätigt jedoch Ergebnisse u.a. von HOLMBERG (1976). Entgegen der Annahme, derartige Versuchsergebnisse, etwa auch nach verschiedenartigen Vorbehandlungen, seien ein Hinweis auf die Existenz von "Subchromatiden" (WOLFF, 1961, 1969, 1970, 1973; WOLFF und LUIPPOLD, 1964), kann heute auf der Basis der von BENDER et al. (1974) entwickelten Vorstellungen die Bildung von Chromatidenaberrationen nach  $G_1$ -Bestrahlung auf DNS-Einzelstrangbrüche zurückgeführt werden.

Demgegenüber liegen die Häufigkeiten Achromatischer Läsionen nach Bestrahlung menschlicher Leukozyten im  $G_0/G_1$ -Stadium (möglicherweise mit Ausnahme der 14 Std.-Serie) im Bereich der unbestrahlten Kontrollen. Dieses Ergebnis kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden,

daß Achromatische Läsionen keine "echten" Chromatidenaberrationen darstellen, wie sie nach Induktion von DNS-Doppel- oder Einzelstrangbrüchen zu erwarten wären, sondern eher Fältelungsdefekte der Chromosomen sein könnten (vergl. SCHEID und TRAUT, 1968, 1969, 1970, 1971 a, b, c). Ein Vergleich der Wirkung von Miracil D bei *Drosophila* (LÜERS, 1955) und bei menschlichen Leukozyten (OBE, 1969) unterstützt diese Vorstellung ebenso, wie die Ergebnisse von Untersuchungen zum Einfluß von Natriumfluorid auf die Raten Trenimon-induzierter Chromosomenmutationen bei menschlichen Leukozyten (OBE und SLACIK-ERBEN, 1973; SLACIK-ERBEN und OBE, 1976; SLACIK-ERBEN, 1976) und zur Wirkung von Streptomycin und Dihydrostreptomycin auf menschliche Chromosomen (OBE, 1970).

#### Bestrahlung während der S- und der frühen G<sub>2</sub>-Phase

Wie bereits erwähnt, kann davon ausgegangen werden, daß sich bei Verwendung des Ham's F-10 Kultursystems die früh replizierenden Zellen, die im vorliegenden Experiment untersucht wurden, zwischen 25 und 35 Std. nach Ansatz in der S- bzw. G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus befinden. Die mittlere Dauer der S-Phase einer menschlichen Zelle beträgt 6-8 Std. Demnach erfolgten in Experiment III. 5 die nach 29, 31 und 33 Std. vorgenommenen Röntgenbestrahlungen während der S-Phase früh replizierender Zellen. Zumindest die Bestrahlung zu einem Zeitpunkt von 35 Std. nach Ansatz dürfte diese Zellen bereits im G<sub>2</sub>-Stadium erreichen. Während die dem Experiment zugrunde liegenden Zellzykluscharakteristika (Beginn der DNS-Synthese, Zeitpunkt der DNS-Synthesemaxima, Beginn der Mitoseaktivität, Mitosemaxima) menschlicher Leukozyten im Ham's F-10 Kultursystem als gut gesichert gelten können (DUDIN et al.,

1974; SLACIK-ERBEN, 1976), müssen bei der Beurteilung der Ergebnisse nach Bestrahlung der S/G<sub>2</sub>-Phase jedoch die Effekte einer strahleninduzierten Zellzyklusverzögerung bedacht werden (bei Bestrahlung in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase dürften derartige Effekte wegen der erheblich größeren Zeiträume für die erhaltenen Ergebnisse von untergeordneter Bedeutung sein).

Wegen der im Kulturzeitraum von 25-35 Std. bereits vorliegenden Asynchronie könnte eine Zellzyklusverzögerung von wenigen Stunden dazu führen, daß Zellen, die in der späten S-oder der frühen G<sub>2</sub>-Phase bestrahlt wurden, bis zur Aufarbeitung nach 45 Std. noch nicht in die Mitose eingetreten sind und daher nicht zur Untersuchung gelangen. Bestrahlungen in der späteren G<sub>2</sub>-Phase konnten nicht vorgenommen werden, denn nach 35 Std. treten in diesem Kultursystem bereits erste Mitosen auf. Da in dem vorliegenden Versuchsansatz möglichst alle Mitosen der ersten Subpopulation von Zellen erfaßt werden sollten, war wegen der zeitlichen Variabilität des Auftretens von Mitosen früh replizierender Zellen die ausgedehnte Colcemidbehandlung notwendig. Als gesichert kann daher nur gelten, daß die erhaltenen Ergebnisse, trotz höchstwahrscheinlich auch in der frühen G<sub>2</sub>-Phase vorgenommener Bestrahlung, nur in Relation zur S-Phase früh replizierender Zellen gesetzt werden können. Eine weitere Differenzierung könnte durch zusätzliche <sup>3</sup>H-TdR-Markierung, die allerdings weitere Probleme aufwirft, vorgenommen werden.

Nach Bestrahlung zwischen 25 und 35 Std. konnten mit zunehmender Kulturdauer geringere Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen (Dizentrische und Ringchromosomen) nachgewiesen werden. Nach Bestrahlung zu einem Zeitpunkt von 35 Std. traten überhaupt keine Aberrationen

des chromosomalen Typs mehr auf (Fragmente/Isochromatidenbrüche müssen aus den erwähnten Gründen hierbei außer acht bleiben). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß mit fortschreitender DNS-Replikation zunehmend weniger und schließlich gar keine funktionell einsträngigen Chromosomen mehr vorliegen (siehe RIEGER und MICHAELIS, 1967). Gemäß dieser Vorstellung kann sogar gefordert werden, daß die im vorliegenden Experiment analysierten Zellen 35 Std. nach Kulturbeginn die DNS-Synthese bereits abgeschlossen haben. Entgegen der Erwartung nehmen die Häufigkeiten chromatidaler Aberrationen (Chromatidenbrüche und -translokationen; dasselbe gilt auch für die Fragmente/Isochromatidenbrüche) nach Bestrahlung in dem genannten Kulturzeitraum nur unwesentlich oder gar nicht zu. Dieses Ergebnis könnte, in Bestätigung der Befunde einer extremen Strahlenresistenz der S-Phase menschlicher Leukozyten in vitro, bezogen auf Austauschaberrationen (BREWEN, 1965), möglicherweise in diesem Sinne erklärt werden. Besonders in anbetracht der im vorliegenden Experiment ermittelten, gleichfalls niedrigen Raten von Chromatidenbrüchen, scheint mit dem Begriff "Resistenz" zunächst nur eine recht kursorische, unbefriedigende Erklärungsmöglichkeit vorzuliegen. Die geläufige Vorstellung von einer weitgehenden Komplementarität der Häufigkeiten von Chromosomen- und Chromatidenaberrationen nach S-Phase-Bestrahlung, je nach "Replikationsgrad", die auch in oft reproduzierte, schematische Darstellungen Eingang gefunden hat (siehe z.B. RIEGER und MICHAELIS, 1967; EVANS und O'RIORDAN, 1975), trägt vielleicht doch etwas zu formalen Charakter. Obwohl die vorliegenden Ergebnisse der S-Phase-Bestrahlung menschlicher Leukozyten in detaillierteren Versuchen, etwa in Kombination mit  $^3\text{H}$ -TdR-Markierung, verifiziert und erweitert werden

sollten, könnten sie jedoch einen Hinweis auf eine größere Komplexität der Mechanismen der Entstehung von Chromosomenmutationen nach Bestrahlung von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus darstellen. Wie u.a. die Ergebnisse von Untersuchungen vorzeitig kondensierten Chromatins (PCC) in der S-Phase nahelegen (Übersicht bei SPERLING und RAO, 1974), liegen die Chromosomen in diesem Zellzyklusstadium in einem weitgehend "desintegrierten" Zustand vor. Vielleicht bedingt diese autosynthetische Funktionsform des Chromatins während weiter Bereiche innerhalb der S-Phase die erwähnte "Resistenz" gegenüber Röntgenbestrahlungen, sei es durch die Möglichkeit einer äußerst effektiven Reparatur oder durch die mikromorphologische Besonderheit dieses Zustandes. So könnte z.B. die während der DNS-Replikation erfolgende Strangtrennung die Induktion von DNS-Doppelstrangbrüchen erschweren (vergl. BENDER et al., 1974).

In Bezug auf das weiter oben diskutierte Problem der Achromatischen Läsionen als mögliche Mutationsäquivalente sollte an dieser Stelle nachgetragen werden, daß auch nach Bestrahlung in der S-Phase des Zellzyklus menschlicher Leukozyten keine Erhöhung der Häufigkeiten dieses Aberrationstyps gegenüber unbehandelten Kontrollen festgestellt werden konnte.

IV. 5) Vorzeitige Chromosomenkondensation (PCC)  
nach Induktion von Chromosomenmutationen

Befindet sich in einer Zelle neben mitotischen Chromosomen Chromatin in einem beliebigen anderen Stadium des Zellzyklus, so tritt eine vorzeitige Kondensation des Interphasechromatins ein (Übersicht bei SPERLING und RAO, 1974). Ein derartiges Phänomen kann auch nach Induktion von Chromosomenmutationen (in vivo oder in vitro) beobachtet werden (IKEUCHI, 1973; IKEUCHI und SANDBERG, 1970; IKEUCHI et al., 1972; KÜRTEN und OBE, 1975 a, b; OBE und BEEK, 1975; OBE et al., 1975 b, c). Es ist seit langem bekannt, daß nach Induktion von Chromosomenmutationen in teilungsaktiven Zellen Mikrokernne auftreten (siehe RIEGER und MICHAELIS, 1967), deren Entstehung auf Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen zurückzuführen ist, die während der Mitose in der Äquatorialebene der Spindel liegen bleiben. Wird derartiges "lagging chromatin" bei der Neubildung der Kernmembran nicht mit in den Hauptkern eingeschlossen, so umgibt es sich mit einer eigenen Kernmembran und es entsteht eine mehrkernige Zelle, deren quantitativ normaler Chromatinbestand auf verschiedene Kernkompartimente verteilt ist. Aus bisher unbekannten Gründen tritt in der auf die Mikrokernbildung folgenden Interphase eine Asynchronie zwischen Haupt- und Mikrokern auf, die mit Hilfe der  $^3\text{H}$ -TdR-Autoradiographie nachgewiesen werden kann, wobei der Mikrokern offenbar relativ zum Hauptkern im Zellzyklus zurückbleibt (KATO und SANDBERG, 1968). Tritt der Hauptkern nach dieser Interphase in die Mitose ein, so induziert er eine vorzeitige Chromosomenkondensation (PCC) des Mikrokernchromatins. Mikrokernbildung und vorzeitige Chromosomenkondensation sind offenbar ein generell mit dem Auftreten von Chromosomenmutationen in teilungsaktiven Zellen verbundenes

Phänomen (siehe OBE et al., 1976 a), dessen Klärung von erheblicher Bedeutung für Grundlagen- wie angewandte Forschung sein dürfte.

Mit Experiment III. 6 der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zur Klärung der kausalen Zusammenhänge der Entstehung von "Mikrokern-PCC" nach Röntgenbestrahlung menschlicher Leukozyten in vitro geleistet werden.

PCC aus Mikrokernen ist, entsprechend der oben dargestellten Entstehungsweise, frühestens in der zweiten Mitose nach Aberrationsinduktion zu erwarten. In Experiment III. 6 wurde aus diesem Grund eine dreitägige Kulturdauer gewählt. Wie die Ergebnisse von Experiment III. 7 A dieser Arbeit zeigen, liegen nach 72-stündiger Kulturdauer in Ham's F-10 Kulturen überwiegend zweite Mitosen nach Kulturbeginn vor. Als Hinweis auf das Vorhandensein zumindest zweiter Mitosen in Experiment III. 6 kann auch das Auftreten von Polyploidien und Endoreduplikationen gewertet werden (siehe BENDER und BREWEN, 1969; HEDDLE et al., 1967).

#### Dosis-Effekt-Beziehungen von Chromosomenmutationen, Mikrokernen und PCC

Wie die Untersuchung der Häufigkeiten von Chromosomenmutationen, Mikrokernen und PCC nach Röntgenbestrahlung menschlicher Leukozytenkulturen mit 100, 200, 300, 400 und 500 R zeigen, läßt sich für die Austauschaberrationen vom chromosomalen Typ (Dizentrische und Ringchromosomen) eine eindeutige Dosis-Effekt-Beziehung nachweisen. Chromatidale Austauschaberrationen (Translokationen und Triradiale) treten in weitgehend gleichförmig niedrigen Häufigkeiten auf. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Experiment III. 5 nach Röntgenbestrahlung in der späten G<sub>1</sub>-Phase menschlicher Leukozy-

ten zu erwarten (siehe auch Diskussion IV. 4). Trendmäßig lassen sich Dosis-Effekt-Beziehungen für die Polyploidien und Mikrokerne annehmen, nicht jedoch für Endoreduplikationen und PCC. Hierbei müssen jedoch vor allem die relativ geringen Häufigkeiten dieser Schädigungstypen (im weiteren Sinne), Zellzyklusverzögerungen, unterschiedliche Strahlensensitivitäten von Subpopulationen etc. bedacht werden. Eine Dosis-Effekt-Beziehung ist auch für Endoreduplikationen (siehe YU und SINCLAIR, 1972) und PCC (OBE und BEEK, 1975) nach Röntgenbestrahlung zu erwarten, kann jedoch anhand des in Experiment III. 5 erhobenen Materials nicht nachgewiesen werden.

Zur Erklärung der relativ zu den Chromosomenaberrationen allgemein niedrigen Raten von Mikrokernen und PCC kommen u.a. in Frage:

- 1) Störungen des Zellphysiologischen Gleichgewichts mikrokernhaltiger Zellen; die zweite Mitose nach Aberrationsinduktion wird nicht mehr erreicht.
- 2) Einschluß "potentiellen Mikrokernchromatins" in den Hauptkern der Zelle.

#### Analyse der PCC-Typen

In Bestätigung der Befunde von OBE et al. (1975 b) und OBE und BEEK (1975) wurden in der vorliegenden Arbeit vor allem PCC des S-Phase-Typus in marginaler Lage gefunden. Die marginale Lage der PCC ist ein deutlicher Hinweis auf die Entstehungsweise aus Mikrokernen. Für etwa 50% der S-Phase-PCC ließ sich eine DNS-Synthese im Zeitraum der  $^3\text{H}$ -TdR-Behandlung, und damit auch der funktionelle S-Phase-Zustand dieses Chromatins zum Zeitpunkt der Mitose des Hauptkerns autoradiographisch nachweisen. Erwartungsgemäß wurden markierte  $\text{G}_2$ -PCC in keinem Fall gefunden.  $\text{G}_1$ -PCC fehlten völlig.

Während die überwiegend marginale Lage der PCC in befriedigender Weise auf ihre Entstehung aus Mikrokernen zurückgeführt werden kann, ist bisher ungeklärt, warum hauptsächlich PCC des S-Phase-Typus auftreten,  $G_2$ -PCC nur selten vorkommen und  $G_1$ -PCC meist vollständig fehlen. Dieses Problem wird weiter unten im Zusammenhang mit der Asynchronie der Mikrokernkerne diskutiert.

#### Analyse der Mikrokernkerne

Durch Alternativmarkierung von Haupt- und Mikrokern konnte in Experiment III. 5 für etwa 40% aller untersuchten Zellen Asynchronie zwischen diesen beiden Kernkompartimenten autoradiographisch nachgewiesen werden. Eine derartige Alternativmarkierung weist auf eine erhebliche Asynchronie hin. Eine geringere Asynchronie, die jedoch durchaus bereits zur Bildung von PCC führen könnte, ist mit dieser Methode nicht zu erfassen. Die im allgemeinen ähnlichen Raten von Mikrokernen und PCC deuten darauf hin, daß in nahezu allen Zellen mit Haupt- und Mikrokern Asynchronie vorliegen müßte.

Von erheblichem Interesse für eine Klärung der Mechanismen der PCC-Entstehung aus Mikrokernen ist der Befund einer Dosisunabhängigkeit der Asynchronie zwischen Haupt- und Mikrokern. Die Bildung von Mikrokern-PCC überhaupt, sowie die relativen Anteile der PCC-Typen ( $G_1$ , S und  $G_2$ ) zueinander sind letztlich, nach erfolgter Mikrokernbildung, von dem Ausmaß der Asynchronie zwischen den beiden Kernelementen abhängig. Wäre lediglich der Grad einer "allgemeinen" Schädigung des im Mikrokern eingeschlossenen Chromatins Ursache des Zurückbleibens der Mikrokernkerne im Zellzyklus, so sollte mit steigender Röntgenstrahlendosis Asynchronie zwischen

Haupt- und Mikrokern deutlich häufiger festzustellen sein. Die weitgehend konstante Häufigkeit von Zellen mit asynchronem Haupt- und Mikrokern nach Bestrahlung mit 100-500 R, sowie die stets gleichbleibend hohen Raten von S-PCC, verbunden mit dem Fehlen von  $G_1$ -PCC und den niedrigen Häufigkeiten des  $G_2$ -Typus, deuten insgesamt darauf hin, daß eine schädigungsspezifische, Dosis-Effekt-abhängige Asynchronie nicht angenommen werden kann. Offenbar liegt in der überwiegenden Zahl der Fälle eine "mittlere" Asynchronie vor, die zur Bildung von vor allem S-PCC führt. Möglicherweise kommen daher regulative zellbiologische Mechanismen als Ursache der Asynchronie zwischen Haupt- und Mikrokern in Frage.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß Inhibitoren der DNS-Synthese zu einer Senkung der Häufigkeiten strahleninduzierter Mikrokern-PCC bei menschlichen Leukozyten in vitro führen (MADLE et al., 1976).

#### Kinetochornahes Heterochromatin in Mikrokernen

Mit Hilfe der von SUMNER (1972) entwickelten Methode konnte in Experiment III. 5 gezeigt werden, daß ca. 13% der Mikrokerne (nach Bestrahlung mit 300 R) kinetochornahes Heterochromatin enthalten. Dieses Ergebnis ist auch nach Anwendung einer anderen Methode (ARRIGHI und HSU, 1971) nahezu identisch reproduzierbar (OBE und BEEK, 1975). Die erstaunliche Übereinstimmung mit den Häufigkeiten von  $G_2$ -PCC (im Mittel ca. 12%) könnte vielleicht auf einen möglichen Zusammenhang zwischen kinetochornahem Heterochromatin und verminderter Verzögerung derartiger Mikrokerne hinweisen.

#### IV. 6) Differenzierung von Schwesterchromatiden durch BUdR-Markierung

Mit Hilfe einer neueren Methode zur morphologischen Differenzierung von Schwesterchromatiden wurden in Experiment III. 7 der vorliegenden Arbeit die Häufigkeiten erster, zweiter und dritter Mitosen in Ham's F-10 Kulturen nach dreitägiger Inkubation, sowie Schwesterchromatidenaustausche (SCE) in menschlichen Leukozytenchromosomen untersucht. Die Ergebnisse der Analyse der Mitosehäufigkeiten wurden bereits diskutiert (siehe Diskussion IV. 1). Zellzyklusanalysen stellen eine unter zahlreichen Möglichkeiten der effektiven Nutzung einer derartigen Methode dar, eine weitere ist die Untersuchung von SCE.

Mit autoradiographischen Methoden wurden SCE erstmals von TAYLOR et al. (1957) analysiert. Obwohl die Raten von SCE durch die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -TdR (BREWEN und PEACOCK, 1969; GIBSON und PRESCOTT, 1972) und auch BUdR ansteigen (KATO, 1974 b; LAMBERT et al., 1976; LATT, 1974 a, b; WOLFF und PERRY, 1974), kann aus Untersuchungen an Ringchromosomen geschlossen werden, daß SCE auch "spontan" auftreten (McCLINTOCK, 1938). In Experiment III. 7 wurde für eine BUdR-Konzentration von  $10^{-5}\text{M}$  eine Rate von 4 bzw. 5 SCE pro Metaphaseplatte für zwei verschiedene Blutspender ermittelt. LATT (1974 b) fand bei derselben Konzentration höhere SCE-Häufigkeiten bei menschlichen Leukozytenchromosomen. Diese Diskrepanz könnte durch interindividuelle Schwankungen der Spontanraten von SCE verursacht sein. Möglicherweise spielen hierbei wieder Subpopulationen menschlicher Leukozyten eine Rolle (vergl. Diskussion IV. 1).

Nach Behandlung mit dem alkylierenden Chemomutagen Trenimon konnte eine annähernd dreifache Erhöhung der SCE-Raten bei einer Konzentration von  $10^{-8}M$  nachgewiesen werden. Auch die Anzahl der Bruchereignisse pro Zelle liegt nach Trenimonbehandlung etwa dreimal höher als in lediglich BUdR-behandelten Serien. In nur BUdR-behandelten Kulturen traten SCE 100-200 mal häufiger auf als Bruchereignisse pro Zelle. Auch nach Trenimonbehandlung blieb diese Relation erhalten. Diese Befunde bestätigen Ergebnisse von LATT (1974 a) und KATO (1974 b). Demnach besteht möglicherweise eine relativ konstante Korrelation zwischen den Häufigkeiten von SCE und Bruchereignissen pro Zelle. Eine Erhöhung der SCE-Raten wurde auch nach Behandlung mit Mitomycin C und Mechlormethamin festgestellt (LATT, 1974 b), beides Chemomutagene, die wie Trenimon ein "cross-linking" der DNS hervorrufen. Im Gegensatz dazu erhöht MNNG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin) zwar die Häufigkeiten von Chromosomenmutationen, nicht aber von SCE (KATO, 1974 a). Ferner konnte nach Behandlung mit verschiedenen Mutagenen eine Verminderung der induzierten SCE-Raten durch Nachbehandlung mit Coffein erreicht werden; für andere Mutagene gilt dies jedoch nicht (KATO, 1974 a). Alle genannten und zahlreiche weitere Befunde deuten darauf hin, daß die Bildung von SCE in uneinheitlicher, mutagenspezifischer Weise von Repair-Vorgängen und DNS-Synthese abhängig ist. Das Phänomen SCE könnte einen distinkten Mechanismus chromosomaler Funktionen widerspiegeln, der im Bereich zwischen DNS-Synthese und Chromosomenmutationen anzusiedeln ist und dessen Aufklärung erhebliche Einsichten in Bau und Funktion der Chromosomen liefern könnte.

Neben diesem Aspekt aus dem Bereich cytogenetischer Grundlagenforschung sind SCE auch für die Mutagenitätsprüfung von Bedeutung. Mutagene, bei denen die Häufigkeiten von SCE und Chromosomenmutationen in der oben dargestellten Weise miteinander korrelieren, lassen sich anhand des "SCE-Tests" bereits in Konzentrationen nachweisen, bei denen noch keine oder kaum abzusichernde Erhöhungen der Raten von Chromosomenmutationen feststellbar sind (LATT, 1974 b; Experiment III. 7 B der vorliegenden Arbeit). Im Falle negativer Befunde kann eine Mutagenität jedoch nicht ausgeschlossen werden. Im Hinblick auf eine mögliche Mutagenität von Blei wurden in den letzten Jahren zum Teil widersprüchliche Befunde mit dem "menschlichen Leukozyten-testsystem" erhoben (vergl. BAUCHINGER et al., 1972; BEEK und OBE, 1974; DEKNUDT et al., 1973; FORNI und SECCHI, 1972; LEONARD und GERBER, 1973; OBE und SPERLING, 1970; O'RIORDAN und EVANS, 1974; SCHMID et al., 1972; SCHWANITZ et al., 1970; SPERLING et al., 1970). Aus diesem Grund wurde in Experiment III. 7 C der mögliche Effekt einer Bleiacetatbehandlung auf die Häufigkeiten von SCE in menschlichen Leukozytenchromosomen in vitro untersucht. Die verwendete Bleiacetatkonzentration ( $10^{-5}M$ ) liegt in einem Bereich, für den positive Befunde im Hinblick auf Chromosomenmutationen nach in vitro-Behandlung menschlicher Leukozyten publiziert wurden (SCHWANITZ et al., 1970).

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, wurde in Experiment III. 7 C weder eine Erhöhung der Häufigkeiten von Chromosomenmutationen, noch der SCE-Raten gefunden. Ein solcher Befund berechtigt nicht zu der Aussage, eine Bleiacetatbehandlung hätte keinen mutagenen Effekt. Die in der Einleitung dieser Arbeit diskutierten Einschränkungen der Aussagekraft aller cytogenetischen Testsysteme betreffen in gleicher Weise SCE. Dennoch stellt der

"SCE-Test" aufgrund seiner höheren Sensitivität gegenüber bestimmten Mutagengruppen eine wertvolle Ergänzung der verfügbaren cytogenetischen Testmethoden dar (siehe auch PERRY und EVANS, 1975).

### Schlußbetrachtung

Die ohnehin oft willkürliche Unterteilung in Grundlagen- und angewandte Forschung einzelner Arbeitsbereiche erscheint bei der cytogenetischen Mutationsforschung besonders unsinnig. Der zur Zeit noch recht lückenhafte Kenntnisstand der Mechanismen von Induktion und Manifestation der Chromosomenmutationen, die mangelnde Verfügbarkeit optimal definierter Testsysteme einerseits und die dringende Notwendigkeit einer Prüfung der Vielzahl potentiell mutagener Agentien andererseits führen meist zu einer unmittelbaren Relevanz von Ergebnissen der Grundlagenforschung für die Mutagenitätsprüfung. Umgekehrt liefert die differenzierte "Testung" von potentiellen Mutagenen auch Einsichten von grundsätzlicher biologischer Bedeutung. Die Probleme und Konsequenzen einer genetischen Gefährdung des Menschen, oder im Grunde ganzer Ökosysteme, sind in ihrer Komplexität nur schwer zu erfassen, und offenbar noch schwerer verständlich und verantwortlich zu vermitteln. Es bleibt zu hoffen, daß der enge Zusammenhang zwischen Mutagenese und Carcinogenese zu der breiten Publizität der gesamten Problematik führt, die ihrer Relevanz entspricht.

## V. Zusammenfassung

- 1) In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem Untersuchungen zur speziellen Problematik der menschlichen Leukozytenkultur als Testsystem für Chromosomenmutationen vorgenommen. In allen Experimenten wurde das Ham's F-10 Kultursystem verwendet.
- 2) Mit Hilfe der  $^3\text{H}$ -TdR-Autoradiographie konnte gezeigt werden, daß zwei Subpopulationen von Leukozyten in diesem Kultursystem zeitlich getrennt, nacheinander in die S-Phase des Zellzyklus eintreten.
- 3) Diese Subpopulationen unterscheiden sich in ihrer Mutagensensitivität voneinander: Nach Behandlung mit einem alkylierenden Chemomutagen (A 139) in der S-Phase wiesen Mitosen der ersten Subpopulation relativ zur zweiten dreimal mehr Chromatidentranslokationen auf. Nach Röntgenbestrahlung im  $G_0$ -Stadium wurden in Zellen der ersten Subpopulation etwa doppelt soviel Dizentrische Chromosomen gefunden, wie in Zellen der zweiten. In beiden Experimenten wurden die Subpopulationen anhand der  $^3\text{H}$ -TdR-Autoradiographie identifiziert.
- 4) Durch Markierung mit  $^3\text{H}$ -UR und anschließende Autoradiographie wurden die Häufigkeiten RNS-synthetisierender Zellen in stündlichen Intervallen für einen Kulturzeitraum ermittelt, der den gesamten ersten Zellzyklus beider Subpopulationen nach PHA-Stimulierung umfaßt. Es zeigte sich, daß im Bereich der  $G_1$ -Phase eine zweigipflige Verteilung von RNS-Synthesemaxima auftritt, die mit den beiden Subpopulationen in Zusammenhang gebracht werden kann. Im weiteren Verlauf des Zellzyklus steigen die Häufigkeiten  $^3\text{H}$ -UR-markierter Zellen relativ kontinuierlich an.
- 5) Auf der Basis der bisher bekannten und der in dieser Arbeit ermittelten Befunde wird der Versuch einer

zusammenfassenden Charakterisierung des Ham's F-10 Kultursystems unternommen.

- 6) In Ausnutzung der relativen Definiertheit dieses Kultursystems wurden Strahlensensitivität und Aberrationsspektrum vor allem der  $G_0/G_1$ -Phase, sowie der S-Phase menschlicher Leukozyten ermittelt. Es zeigte sich, daß Röntgenbestrahlung in einem mittleren Zeitraum der  $G_1$ -Phase zu deutlich höheren Aberrationsraten führt, als Bestrahlungen in  $G_0$ , sowie in der frühen oder der späten  $G_1$ -Phase. Als mögliche Ursache für dieses Phänomen werden vor allem höhere Interaktionswahrscheinlichkeiten von Bruchflächen infolge unterschiedlicher "Bewegungszustände" oder Umlagerungen des Chromatins während der Blastentransformation diskutiert. Nach Bestrahlung zu verschiedenen Zeiten innerhalb der S-Phase wurden erwartungsgemäß mit fortschreitender Kulturdauer zunehmend geringere Raten chromosomaler Aberrationen gefunden, während die Häufigkeiten chromatidaler Aberrationen jedoch nicht in nennenswerter Weise anstiegen. Für dieses Phänomen wird als Erklärungsmöglichkeit eine spezifische "Resistenz" zumindest weiter Bereiche der S-Phase vorgeschlagen, die möglicherweise auf die besondere mikromorphologische Struktur des Chromatins oder eine äußerst effektive Reparatur chromosomaler Schäden nach Röntgenbestrahlung in der S-Phase des Zellzyklus zurückgeführt werden könnte.
- 7) In einem weiteren Experiment wurde am "Modellsystem" menschliche Leukozytenkultur das Schicksal Röntgenstrahlen-induzierter Chromosomenmutationen im Verlauf weiterer Zellzyklen nach Aberrationsinduktion untersucht. Nach Ablauf der ersten Mitose nach Aberrationsinduktion treten Mikrokerne auf, die relativ zum Hauptkern im darauffolgenden Zellzyklus zurückbleiben. Mit Hilfe der  $^3\text{H}$ -TdR-Autoradiographie konnte

bei ca. 40% derartiger Zellen eine Asynchronie zwischen Haupt- und Mikrokern nachgewiesen werden. In der zweiten Mitose nach Aberrationsinduktion induziert das mitotische Chromatin des Hauptkerns eine vorzeitige Kondensation (PCC) des Mikrokern-Chromatins. Die Untersuchung derartiger "Mikrokern-PCC" nach morphologischen Gesichtspunkten zeigte, daß zumeist PCC des S-Phase-Typus und seltener des  $G_2$ -Phase-Typus auftraten.  $G_1$ -PCC wurde in keinem Fall gefunden. Für ca. 50% aller S-PCC ließ sich eine DNS-Syntheseaktivität im Zeitraum der Mitose des Hauptkerns autoradiographisch nachweisen. Die meisten derartigen PCC wurden in marginaler Lage gefunden. Dies läßt sich mit der Entstehungsweise aus Mikrokernen erklären. Für einen breiten Dosisbereich von Röntgenstrahlen (100 - 500 R) wurde kein Dosis-Effekt auf das Ausmaß der Asynchronie zwischen Haupt- und Mikrokern gefunden. Insbesondere dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Asynchronie eher auf zellbiologische Regulationsmechanismen als auf eine dosisabhängige Schädigung des Mikrokern-Chromatins zurückzuführen sein könnte. In einem zusätzlichen Versuch wurde in Mikrokernen kinetochornahes Heterochromatin in einer Häufigkeit nachgewiesen, die der von  $G_2$ -PCC entspricht.

- 8) In dem abschließenden Experiment wurde eine BUdR-Substitutionsmethode zur morphologischen Differenzierung von Schwesterchromatiden verwendet. Zunächst wurden die Häufigkeiten erster, zweiter und dritter Mitosen nach dreitägiger Kulturdauer ermittelt, deren Auftreten nebeneinander als Ausdruck der zunehmenden Asynchronie gewertet wurde. Zweite Mitosen traten am häufigsten auf. Bei verschiedenen Blutspendern wurden die Häufigkeiten von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) untersucht. Die Spontanraten

lagen bei 4 bzw. 5 SCE pro Metaphaseplatte. Die Behandlung mit einem alkylierenden Chemomutagen (Trenimon) führte zu einer starken Erhöhung der SCE-Raten. Bleiacetat erwies sich in dieser Hinsicht als unwirksam. Der "SCE-Test" wird als ergänzende Methode zur Mutagenitätsprüfung empfohlen.

VI. Literatur

- AHERN, T. and KAY, J. E., 1975: Protein synthesis and ribosome activation during the early stages of phytohemagglutinin lymphocyte stimulation  
Expt. Cell Res. 92, 513-515
- AHNSTRÖM, G. and NATARAJAN, A. T., 1971: Repair of gamma-ray and neutron induced lesions in germinating barley seeds  
Int. J. Radiat. Biol. 19, 433-443
- AMES, B. N., DURSTON, W. E., YAMASAKI, E., and LEE, F. D., 1973: Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection  
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 70, 2281-2285
- ARAKAKI, D. T. and SPARKES, R. S., 1963: Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood  
Cytogenetics 2, 57-60
- ARRIGHI, F. E. and HSU, T. C., 1971: Localization of heterochromatin in human chromosomes  
Cytogenetics 10, 81-86
- AUERBACH, C., 1973: History of research on chemical mutagenesis. In: A. HOLLAENDER (Ed.), Chemical mutagens, principles and methods for their detection, Vol. III, pp. 1-19, Plenum Press, New York - London
- AUGENER, W., COHNEN, G., REUTER, A., and BRITTINGER, G., 1974: Decrease of T lymphocytes during ageing  
Lancet I, 1164
- BAKER, T. G., 1971: Comparative aspects of the effects of radiation during oogenesis  
Mutat. Res. 11, 9-22
- BAUCHINGER, M., SCHMID, E. und SCHMIDT, D., 1972: Chromosomenanalyse bei Verkehrspolizisten mit erhöhter Bleilast  
Mutat. Res. 16, 407-412

- BEEK, B. and OBE, G., 1974: Effect of lead acetate on human leukocyte chromosomes in vitro  
*Experientia* 30, 1006-1007
- BENDER, M. A. and BREWEN, J. G., 1969: Factors influencing chromosome aberration yields in the human peripheral leukocyte system  
*Mutat. Res.* 8, 383-399
- BENDER, M. A., GOOCH, P. C., and PRESCOTT, D. M., 1962: Aberrations induced in human leukocyte chromosomes by (<sup>3</sup>H)labeled nucleosides  
*Cytogenetics* 1, 65-74
- BENDER, M. A., GRIGGS, H. G., and WALKER, P. L., 1973 a: Mechanisms of chromosomal aberration production. I. Aberration induction by ultraviolet light  
*Mutat. Res.* 20, 387-402
- BENDER, M. A., BEDFORD, J. S., and MITCHELL, J. B., 1973 b: Mechanisms of chromosomal aberration production. II. Aberrations induced by 5-bromodeoxyuridine and visible light  
*Mutat. Res.* 20, 403-416
- BENDER, M. A., GRIGGS, H. G., and BEDFORD, J. S., 1974: Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation  
*Mutat. Res.* 23, 197-212
- BESSIS, M., 1973: Living blood cells and their ultrastructure. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- BOOTSMA, D., 1965: Changes induced in the first post-irradiation generation cycle of human cells studied by double labeling  
*Expt. Cell Res.* 38, 429-431
- BOOTSMA, D. and LOHMAN, P. H. M., 1968: Mitotic delay after X-irradiation of synchronized mammalian cells cultivated in the presence of BUdR  
*Int. J. Radiat. Biol.* 14, 69

- BREWEN, J. G., 1962: X-ray-induced chromosomal aberrations in corneal epithelium of Chinese hamster Science 138, 820-822
- BREWEN, J. G., 1965: Cell-cycle and radiosensitivity of the chromosomes of human leukocytes Int. J. Radiat. Biol. 2, 391-397
- BREWEN, J. G. and OLIVIERI, G., 1966: The kinetics of chromatid aberrations induced in Chinese hamster cells by tritium-labeled thymidine Radiat. Res. 28, 779-792
- BREWEN, J. G. and PEACOCK, W. J., 1969: The effect of tritiated thymidine on sister-chromatid exchange in a ring chromosome Mutat. Res. 7, 433-440
- BUCKTON, K. E. and PIKE, M. C., 1964: Chromosome investigations on lymphocytes from irradiated patients. Effect of time in culture Nature 202, 714-715
- CARRANO, A. V., 1975: Induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes by X rays and fission neutrons: dependence on cell cycle stage Radiat. Res. 63, 403-421
- CLEAVER, J. E. and THOMAS, G. H., 1972: Biological damage from intranuclear tritium: DNA strand breaks and their repair Science 177, 996-998
- CRIPPA, M., 1966: The rate of ribonucleic acid synthesis during the cell cycle Expt. Cell Res. 42, 371-375
- DEKNUDT, G., LEONARD, A., and IVANOV, B., 1973: Chromosome aberrations observed in male workers occupationally exposed to lead Environm. Physiol. Biochem. 3, 132-138
- DEWEY, W. C. and HUMPHREY, R. M., 1964: Restitution of radiation induced chromosomal damage in Chinese hamster cells related to the cell's life cycle Expt. Cell Res. 35, 262-276

- DEWEY, W. C., HUMPHREY, R. M., and JONES, B. A., 1965:  
Comparisons of tritiated thymidine, tritiated  
water, and cobalt-60 gamma rays in inducing  
chromosomal aberrations  
Radiat. Res. 24, 214-238
- DEWEY, W. C., FURMAN, S. C., and MILLER, H. H., 1970:  
Comparison of lethality and chromosomal damage  
induced by X-rays in synchronized Chinese  
hamster cells in vitro  
Radiat. Res. 43, 561-581
- DIAZ-JOUANEN, E., WILLIAMS Jr., R. C., and STRICKLAND,  
R. G., 1975: Age-related changes in T and B  
cells  
Lancet I, 688-689
- DUDIN, G., BEEK, B., and OBE, G., 1974: The human leu-  
kocyte test system. I. DNA synthesis and mito-  
ses in PHA-stimulated 2-day cultures  
Mutat. Res. 23, 279-281
- DUDIN, G., BEEK, B., and OBE, G., 1976: The human leu-  
kocyte test system. VIII. DNA synthesis and  
mitoses in 3-day cultures stimulated with  
pokeweed mitogen  
Hum. Genet. 32, 323-327
- DUPRAW, E. J., 1970: DNA and chromosomes. Holt, Rinehart  
and Winston, New York
- ENGER, M. D. and TOBEY, R. A., 1969: RNA synthesis in  
Chinese hamster cells. II. Increase in rate  
of RNA synthesis during G<sub>1</sub>  
J. Cell Biol. 42, 308-315
- EVANS, H. J., 1967: Dose-response relations from in  
vitro studies. In: H. J. EVANS, W. M. COURT  
BROWN, A. S. McLEAN (Eds.), Human radiation  
cytogenetics, pp. 20-36, North Holland,  
Amsterdam
- EVANS, H. J. and O'RIORDAN, M. L., 1975: Human peripheral  
blood lymphocytes for the analysis of chromosome  
aberrations in mutagen tests  
Mutat. Res. 31, 135-148

- EVANS, H. J. and SCOTT, D., 1964: Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*  
*Genetics* 49, 17-38
- EVANS, H. J. and SCOTT, D., 1969: The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis  
*Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* 173, 491-512
- FISHBEIN, L., FLAMM, W. G., and FALK, H. L., 1970: Chemical mutagens: environmental effects on biological systems. Academic Press, New York
- FORNI, A. and SECCHI, G. C., 1972: Chromosome changes in preclinical and clinical lead poisoning and correlation with biochemical findings  
*Proc. Intern. Symp. Environm. Health Asp. of Lead*, Amsterdam, October 1972, pp. 473-485
- FRENSTER, J. H., 1974: Ultrastructure and function of heterochromatin and euchromatin. In: H. BUSCH (Ed.), *The cell nucleus*, Vol. I, pp. 565-580, Academic Press, New York
- FROESE, G., 1966: Division delay in HeLa cells and Chinese hamster cells. A time lapse study  
*Int. J. Radiat. Biol.* 10, 353-367
- GAFFNEY, E. V. and NARDONE, R. M., 1968: Nucleolar RNA synthesis in synchronous cultures of strain L-929  
*Expt. Cell Res.* 53, 410-416
- GAJL-PECZALSKA, K. V., HALLGREN, H., KERSEY, J. H., ZUSMAN, J., and YUNIS, E. J., 1974: B lymphocytes during ageing  
*Lancet* II, 163
- GANI, R., 1976: The nucleoli of cultured human lymphocytes. I. Nucleolar morphology in relation to transformation and the DNA cycle  
*Expt. Cell Res.* 97, 249-258

- GERNER, E. W., MEYN, R. E., and HUMPHREY, R. M., 1974:  
The effect of ionizing radiation on the kinetics of DNA replication in synchronized Chinese hamster ovary cells  
Radiat. Res. 60, 62-74
- GIBSON, D. A. and PRESCOTT, D. M., 1972: Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat kangaroo cells by tritium incorporation into DNA  
Expt. Cell Res. 74, 397-402
- HAM, R. G., 1963: An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines  
Expt. Cell Res. 29, 515-526
- HATCHER, N. H. and HOOK, E. B., 1976: Early in vitro division of PHA stimulated cord blood lymphocytes: Implications for study of chromosome breakage  
Am. J. Hum. Genet. 28, 290-293
- HEDDLE, J. A., EVANS, H. J., and SCOTT, D., 1967: Sampling time and the complexity of the human leukocyte culture system. In: H. J. EVANS, W. M. COURT BROWN, A. S. McLEAN (Eds.), Human radiation cytogenetics, pp. 6-19, North Holland, Amsterdam
- HOLLAENDER, A., 1971: Chemical mutagens, principles and methods of their detection, Vol. I and II.  
Plenum Press, New York
- HOLMBERG, M., 1976: Lack of synergistic effect between X-ray and UV irradiation on the frequency of chromosome aberrations in PHA-stimulated human lymphocytes in the G<sub>1</sub> stage  
Mutat. Res. 34, 141-148
- HOWARD, A. and PELC, S. R., 1953: Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage  
Heredity (Suppl.) 6, 261-273

- HOWARD, E. F., 1972: Low molecular weight nuclear RNA in human lymphocytes. A comparison of PHA-treated and control cells  
Expt. Cell Res. 82, 280-286
- HSU, T. C., DEWEY, W. C., and HUMPHREY, R. M., 1962: Radiosensitivity of cells of Chinese hamster in vitro in relation to the cell cycle  
Expt. Cell Res. 27, 441-452
- IKEUCHI, T., 1973: Chromosome pulverization in Chinese hamster multinucleate cells induced by bleomycin and cytochalasin B  
Japan J. Genet. 48, 391-405
- IKEUCHI, T. and SANDBERG, A. A., 1970: Chromosome pulverization in virus-induced heterokaryons of mammalian cells from different species  
J. Natl. Cancer Inst. 45, 951-963
- IKEUCHI, T., WEINFELD, H., and SANDBERG, A. A., 1972: Chromosome pulverization in micronuclei induced by tritiated thymidine  
J. Cell Biol. 52, 97-104
- IKUSHIMA, T. and WOLFF, S., 1974: Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine- and 5-iododeoxyuridine substituted Chinese hamster chromosomes  
Expt. Cell Res. 87, 15-19
- JACOBS, P. A., COURT BROWN, W. M., and DOLL, R., 1961: Distribution of human chromosome counts in relation to age  
Nature 197, 1178-1180
- JASINSKA, J., STEFFEN, J. A., and MICHALOWSKI, A., 1970: Studies on in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA synthesis. II. Kinetics of the initiation of a proliferative response  
Expt. Cell Res. 61, 333-341

- JOHANSEN, J., 1972: DNA synthesis and distribution of first and second divisions in 72-h-cultures of human leukocytes  
*Experientia* 28, 416-417
- KATO, H., 1973: Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine  
*Expt. Cell Res.* 82, 383-390
- KATO, H., 1974 a: Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair  
*Expt. Cell Res.* 85, 239-247
- KATO, H., 1974 b: Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR-labelling method  
*Nature* 251, 70-72
- KATO, H. and SANDBERG, A. A., 1968: Chromosome pulverization in human cells with micronuclei  
*J. Natl. Cancer Inst.* 40, 165-179
- KAY, J. E. and HANDMAKER, S. D., 1970: Uridine incorporation and RNA synthesis during stimulation of lymphocytes by PHA  
*Expt. Cell Res.* 63, 411-421
- KIHLMAN, B. A., 1970: Sub-chromatid exchanges and the strandedness of chromosomes  
*Hereditas* 65, 171-186
- KILLANDER, D. and RIGLER, R., 1965: Initial changes of deoxyribonucleoprotein and synthesis of nucleic acid in phytohemagglutinin-stimulated human leukocytes in vitro  
*Expt. Cell Res.* 39, 701-704
- KILLANDER, D. and RIGLER, R., 1969: Activation of deoxyribonucleoprotein in human leukocytes stimulated by phytohemagglutinin. I. Kinetics of the binding of acridine orange to deoxyribonucleoprotein  
*Expt. Cell Res.* 54, 163-170

- KIM, J. H. and PEREZ, A. G., 1965: Ribonucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells  
*Nature* 207, 974-975
- KLASTERSKA, I., NATARAJAN, A. T., and RAMEL, C., 1976: An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations  
*Hereditas* 83, 153-162
- KLEVECZ, R. R. and STUBBLEFIELD, E., 1967: RNA synthesis in relation to DNA replication in synchronized Chinese hamster cell cultures  
*J. Exp. Zool.* 165, 259-268
- KORENBERG, J. R. and FREEDLENDER, E. F., 1974: Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges  
*Chromosoma* 48, 355-360
- KÜRTEŦ, S. and OBE, G., 1975 a: Premature chromosome condensation in the bone marrow of Chinese hamsters after application of bleomycin in vivo  
*Mutat. Res.* 27, 285-294
- KÜRTEŦ, S. and OBE, G., 1975 b: Premature chromosome condensation in the bone marrow of Chinese hamsters after whole body irradiation with Co<sup>60</sup> gamma rays in vivo  
*Humangenetik* 28, 97-102
- LAMBERT, B., HANSSON, K., LINDSTEN, J., STEN, M., and WERELINS, B., 1976: Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes  
*Hereditas* 83, 163-174
- LATT, S. A., 1974 a: Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes  
*Science* 185, 74-76
- LATT, S. A., 1974 b: Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C  
*Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 71, 3162-3166

- LEEPER, D. B., SCHNEIDERMAN, M. Y., and DEWEY, W. C.,  
1972: Radiation-induced division delay in  
synchronized Chinese hamster ovary cells in  
monolayer culture  
Radiat. Res. 50, 401-417
- LEEPER, D. B., SCHNEIDERMAN, M. Y., and DEWEY, W. C.,  
1973: Radiation-induced cell cycle delay in  
synchronized Chinese hamster cells: comparison  
between DNA synthesis and division  
Radiat. Res. 53, 326-337
- LEONARD, A. et GERBER, G. B., 1973: Dangers genetiques  
d'une intoxication par le plomb  
Ann. Gembloux 79, 109-119
- LETT, J. T. and SUN, C., 1970: The production of strand  
breaks in mammalian DNA by X-rays at different  
stages in the cell cycle  
Radiat. Res. 44, 771-787
- LEVIS, W. R. and ROBBINS, J. H., 1970: Effect of glass  
adherent cells on the blastogenic response  
of "purified" lymphocytes to phytohemagglutinin  
Expt. Cell Res. 61, 153-158
- LING, N. R. and KAY, J. E., 1975: Lymphocyte stimulation.  
North Holland, Amsterdam
- LITTLEFIELD, L. G. and GOH, K.-O., 1973: Cytogenetic  
studies in control men and women. I. Variations  
in aberration frequencies in 29,709 metaphases  
from 305 cultures obtained over a three-year period  
Cytogenet. Cell Genet. 12, 17-34
- LOEB, L. A., EWALD, J. L., and AGARWAL, S. S., 1970:  
DNA polymerase and DNA replication during lymphocyte  
transformation  
Cancer Res. 30, 2514-2520
- LUBS, H. A. and SAMUELSON, J., 1967: Chromosome abnormalities  
in lymphocytes from normal human subjects. A study of 3,720 cells  
Cytogenetics 6, 402-411

- LÜERS, H., 1955: Biologisch-genetische Untersuchungen über die Wirkung eines Thioxanthonderivates an *Drosophila melanogaster*  
Z. Vererbungslehre 87, 93-96
- MADLE, S., NOWAK, J., and OBE, G., 1976: Effects of inhibitors of DNA, RNA and protein synthesis on frequencies and types of premature chromosome condensation from X-ray induced micronuclei  
Hum. Genet. 34, 143-149
- MARTIN, D. W., TOMKINS, G. M., and GRANNER, D., 1969: Synthesis and induction of tyrosine aminotransferase in synchronized hepatoma cells in culture  
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 62, 248-255
- MATTEVI, M. S. and SALZANO, F. M., 1975: Senescence and human chromosome changes  
Hum. Genet. 27, 1-8
- McCLINTOCK, B., 1938: The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes  
Genetics 23, 315-376
- McCLINTOCK, B., 1951: Chromosome organization and gene expression  
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 16, 13
- MEREDITH, P., GERBASE-DE LIMA, M., and WALFORD, R. L., 1975: Age-related changes in the PHA:Con A stimulatory ratios of cells from spleens of a long-lived mouse strain  
Expt. Geront. 10, 247-250
- MICHALOWSKI, A., 1963: Time-course of DNA synthesis in human leukocyte cultures  
Expt. Cell Res. 32, 609-612
- MILLER, D. R., DEWEY, W. C., and MILLER, H. R., 1973: X-ray induced delay in the Chinese hamster cell cycle: dependence on those irradiated under different culturing conditions, BUdR incorporation and hypertonic treatment  
Int. J. Radiat. Biol. 23, 591-602

- MITCHISON, J. M., 1971: The biology of the cell cycle.  
Cambridge University Press
- NATARAJAN, A. T., 1976: Molecular aspects of the origin  
of chromosome structural changes  
Biol. Zbl. 95, 139-156
- NOWELL, P. C., 1960: Phytohaemagglutinin: An initiator  
of mitosis in cultures of normal human leuko-  
cytes  
Cancer Res. 20, 462-466
- OBARA, Y., 1974: The effect of bleomycin on PHA-stimula-  
ted human peripheral lymphocytes: cytogenetic  
and autoradiographic studies  
Sci. Rep. Hirosaki Univ. 21, 57-66
- OBE, G., 1969: Zur Wirkung von Miracil auf menschliche  
Leukocytenchromosomen in vitro  
Molec. Gen. Genet. 103, 326-328
- OBE, G., 1970: Die Wirkung von Streptomycin und Dihydro-  
streptomycin auf menschliche Chromosomen in  
vitro  
Molec. Gen. Genet. 107, 361-365
- OBE, G. and BEEK, B., 1975: The human leukocyte test  
system. VII. Further investigations concer-  
ning micronucleus-derived premature chromosome  
condensation  
Humangenetik 30, 143-154
- OBE, G., BEEK, B., and DUDIN, G., 1975 a: The human leu-  
kocyte test system. V. DNA synthesis and mito-  
ses in PHA-stimulated 3-day cultures  
Humangenetik 28, 295-302
- OBE, G., BEEK, B., and VAIDYA, V. G., 1975 b: The human  
leukocyte test system. III. Premature chromo-  
some condensation from chemically and X-ray  
induced micronuclei  
Mutat. Res. 27, 89-101
- OBE, G., LÜDCKE, J. B. P., WALDENMEIER, K., and SPERLING,  
K., 1975 c: Premature chromosome condensation  
in a case of Fanconi's anemia  
Humangenetik 28, 159-162

- OBE, G., BEEK, B., and SLACIK-ERBEN, R., 1976 a: The use of the human leukocyte test system for the evaluation of potential mutagens. In: W. A. M. DUNCAN, B. J. LEONARD, M. BRUNAUD (Eds.), The prediction of chronic toxicity from short term studies, pp. 118-126, *Excerpta Medica/American Elsevier*, Amsterdam
- OBE, G., BRANDT, K., and BEEK, B., 1976 b: The human leukocyte test system. IX. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 2-day cultures set up with Eagle's minimal essential medium (MEM) *Hum. Genet.* 33, 263-268
- OBE, G. and SLACIK-ERBEN, R., 1973: Suppressive activity by fluoride on the induction of chromosome aberrations in human cells with alkylating agents in vitro *Mutat. Res.* 19, 369-371
- OBE, G. and SPERLING, K., 1970: Zur Wirkung von Bleiacetat auf menschliche Leukozytenchromosomen in vitro *Arbeitsgruppe Blei der Kommission für Umweltgefahren des Bundesgesundheitsamtes Berlin*
- OBE, G., SPERLING, K., and BELITZ, H.-J., 1971: Einige Aspekte zur chemischen Mutagenese beim Menschen und bei *Drosophila* *Angew. Chemie* 83, 301-314
- O'RIORDAN, M. L. and EVANS, H. J., 1974: Absence of significant chromosome damage in males occupationally exposed to lead *Nature* 247, 50-53
- PERRY, P. and EVANS, H. J., 1975: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange *Nature* 258, 121-125

- POGO, B. G. T., 1972: Early events in lymphocyte transformation by phytohemagglutinin. I. DNA-dependent RNA polymerase activities in isolated lymphocyte nuclei  
J. Cell Biol. 53, 635-641
- PREMPREE, T. and MERZ, T., 1969: Radiosensitivity and repair time: the repair time of chromosome breaks produced during the different stages of the cell cycle  
Mutat. Res. 7, 441-451
- RIEGER, R. und MICHAELIS, A., 1967: Chromosomenmutationen. Fischer, Jena
- RIGLER, R. and KILLANDER, D., 1969: Activation of deoxyribonucleoprotein in human leukocytes stimulated by phytohemagglutinin. II. Structural changes of deoxyribonucleoprotein and synthesis of RNA  
Expt. Cell Res. 54, 171-180
- SANKARANARAYANAN, K., 1976 a: Evaluation and re-evaluation of genetic radiation hazards in man. III. Other relevant data and risk assessment  
Mutat. Res. 35, 387-414
- SANKARANARAYANAN, K., 1976 b: Evaluation and re-evaluation of genetic radiation hazards in man. II. The arm number hypothesis and the induction of reciprocal translocations in man  
Mutat. Res. 35, 371-386
- SANTOS MELLO, R., KWAN, D., and NORMAN, A., 1974: Chromosome aberrations and T-cell survival in human lymphocytes  
Radiat. Res. 60, 482-488
- SCHALET, A. P. and SANKARANARAYANAN, K., 1976: Evaluation and re-evaluation of genetic radiation hazards in man. I. Interspecific comparison of estimates of mutation rates  
Mutat. Res. 35, 341-370

- SCHARFF, M. D. and ROBBINS, E., 1965: Synthesis of ribosomal RNA in synchronized HeLa cells  
*Nature* 208, 464-466
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1968: Nonrandom distribution of X-ray-induced achromatic lesions ("gaps") in the chromosomes of *Vicia faba*  
*Mutat. Res.* 6, 481-483
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1969: The distribution of X-ray-induced achromatic lesions ("gaps") within and between the arms of the M-chromosomes of *Vicia faba*  
*Stud. Biophys.* 17, 123-130
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1970: Ultraviolet-microscopical studies on achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in the chromosomes of *Vicia faba*  
*Mutat. Res.* 10, 159-161
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1971 a: Visualisation by scanning electron microscopy of achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in chromosomes of *Vicia faba*  
*Mutat. Res.* 11, 253-255
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1971 b: Visualisation of achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in chromosomes of *Vicia faba* by staining of chromosomal proteins  
*Mutat. Res.* 12, 97-99
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1971 c: On the nature of achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in chromosomes of *Vicia faba*  
*Z. Naturforsch.* 26 b, 1384-1385
- SCHMID, E., BAUCHINGER, M., PIETRUCK, S. und HALL, G., 1972: Die cytogenetische Wirkung von Blei in menschlichen peripheren Lymphocyten in vitro und in vivo  
*Mutat. Res.* 16, 401-406

- SCHWANITZ, G., LEHNERT, G. und GEBHART, E., 1970: Chromosomenschäden bei beruflicher Bleibelastung  
Dtsch. med. Wschr. 95, 1636-1641
- SCOTT, D. and EVANS, H. J., 1967: X-ray-induced chromosomal aberrations in *Vicia faba*: changes in response during the cell cycle  
Mutat. Res. 4, 579-599
- SHEPARD, J. S. and FERRARI, I., 1970: Stage sensitivity and dose response in human leukocytes  
Radiat. Res. 44, 855-866
- SLACIK-ERBEN, R., 1976: Wirkung von Trenimon, Natriumfluorid und deren Kombination auf den Zellzyklus und die Rate chromosomaler Aberrationen in menschlichen Lymphozytenkulturen in vitro  
Inaugural-Diss., Freie Universität Berlin
- SLACIK-ERBEN, R. and OBE, G., 1976: The effect of sodium fluoride on DNA synthesis, mitotic indices and chromosomal aberrations in human leukocytes treated with trenimon in vitro  
Mutat. Res. 37, 253-266
- SMITH, M. A., EVANS, J., and STEEL, C. M., 1974: Age-related variation in proportion of circulating T cells  
Lancet II, 922-924
- SÖREN, L., 1973: Variability of the time at which PHA-stimulated lymphocytes initiate DNA synthesis  
Expt. Cell Res. 78, 201-208
- SÖREN, L. and BIBERFELD, P., 1973: Quantitative studies on RNA accumulation in human PHA-stimulated lymphocytes during blast-transformation  
Expt. Cell Res. 79, 1-9
- SPERLING, K. and RAO, P. N., 1974: The phenomenon of premature chromosome condensation: its relevance to basic and applied research  
Humangenetik 23, 235-258

- SPERLING, K., WEISS, G., MÜNZER, M. und OBE, G., 1970:  
Chromosomenuntersuchungen an bleiexponierten  
Arbeitern  
Arbeitsgruppe Blei der Kommission für Umwelt-  
gefahren des Bundesgesundheitsamtes Berlin
- SPIEGLER, P. and NORMAN, A., 1969: Kinetics of unsche-  
duled DNA synthesis induced by ionizing radia-  
tion in human lymphocytes  
Radiat. Res. 32, 400-412
- STEEL, C. M., EVANS, J., and SMITH, M. A., 1974: Physio-  
logical variation in circulating B cell : T  
cell ratio in man  
Nature 247, 387-389
- STEEL, C. M., EVANS, J., and SMITH, M. A., 1975: Age-  
related changes in T and B cells  
Lancet I, 914-915
- STEFFEN, J. A. and MICHALOWSKI, A., 1973: Heterogeneous  
chromosomal radiosensitivity of phytohemagglu-  
tinin-stimulated human blood lymphocytes in  
culture  
Mutat. Res. 17, 367-376
- STEFFEN, J. A. and STOLZMANN, W. M., 1969: Studies on  
in vitro lymphocyte proliferation in cultures  
synchronized by the inhibition of DNA synthesis.  
I. Variability of S plus G<sub>2</sub> periods of first  
generation cells  
Expt. Cell Res. 56, 453-460
- SUMNER, A. T., 1972: A simple technique for demonstrating  
centromeric heterochromatin  
Expt. Cell Res. 75, 304-306
- TAYLOR, J. H., WOODS, P. S., and HUGHES, W. L., 1957:  
The organization and duplication of chromosomes  
as revealed by autoradiographic studies using  
tritium-labelled thymidine  
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 43, 122-128

- TERASIMA, T. and TOLMACH, L. J., 1963a: Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells  
Expt. Cell Res. 30, 344-362
- TERASIMA, T. and TOLMACH, L. J., 1963 b: Variations in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle  
Biophys. J. 3, 11-33
- UNITED NATIONS REPORT, 1969: 26th session of the general assembly of the United Nations scientific committee on the effects of atomic radiation  
Suppl. 13 (A/7613), p. 98, New York
- VOGEL, E. und SOBELS, F. H., 1976: Mutagenitätsprüfung an Drosophila als Instrument zur Erfassung potentieller Carcinogene  
Biol. Zbl. 25, 405-413
- WALTERS, R. A. and PETERSEN, D. F., 1968: Radiosensitivity of mammalian cells. I. Timing and dose-dependence of radiation-induced division delay  
Biophys. J. 8, 1475-1486
- WALTERS, R. A. and TOBEY, R. A., 1970: Radiosensitivity of mammalian cells. IV. Effects of X-irradiation on the DNA synthetic period of synchronized cells  
Biophys. J. 10, 556-562
- WOLFF, S., 1960: Radiation studies of the nature of chromosome breakage  
Am. Naturalist 94, 85-93
- WOLFF, S., 1961: The doubleness of the chromosome before DNA synthesis as revealed by combined X-ray and tritiated thymidine treatments  
Radiat. Res. 14, 517-518

- WOLFF, S., 1968: Chromosome aberrations and the cell cycle  
Radiat. Res. 33, 609-619
- WOLFF, S., 1969: The splitting of human chromosomes into chromatids in the absence of either DNA or protein synthesis  
Mutat. Res. 8, 207-214
- WOLFF, S., 1970: On the "tertiary" structure of chromosomes  
Mutat. Res. 10, 405-414
- WOLFF, S., 1972: The repair of X-ray-induced chromosome aberrations in stimulated and unstimulated human lymphocytes  
Mutat. Res. 15, 435-444
- WOLFF, S., 1973: Experimental modification of the "tertiary structure" of chromosomes in human lymphocytes. The effect of polyanionic substances and hypertonic salt solutions  
Mutat. Res. 17, 231-237
- WOLFF, S. and ATWOOD, K. C., 1954: Independent X-ray effects on chromosome breakage and reunion  
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 40, 187-192
- WOLFF, S. and LUIPPOLD, H. E., 1955: Metabolism and chromosome break rejoining  
Science 122, 231-232
- WOLFF, S. and LUIPPOLD, H. E., 1964: Chromosome splitting as revealed by combined X-ray and labeling experiments  
Expt. Cell Res. 34, 548-556
- WOLFF, S. and PERRY, P., 1974: Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography  
Chromosoma 48, 341-353

- YEOMAN, L. C., SEEBER, S., TAYLOR, Ch. W., FERNBACH, D. J., FALLETTA, J. M., JORDAN, J. J., and BUSCH, H., 1976: Differences in chromatin proteins of resting and growing human lymphocytes  
Expt. Cell Res. 100, 47-55
- YU, C. K. and SINCLAIR, W. K., 1972: Polyploidy induced by X-rays during the cell cycle of Chinese hamster cells in vitro  
Radiat. Res. 52, 509-519
- ZACKAI, E. H. and MELLMAN, W. J., 1974: Human peripheral blood leukocyte cultures. In: J. J. YUNIS (Ed.), Human chromosome methodology, Second Edition, pp. 95-125, Academic Press, New York

D a n k s a g u n g

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts  
für Genetik der Freien Universität Berlin,  
die mich in meiner Arbeit unterstützt haben,  
insbesondere Herrn Prof. Dr. Günter Obe und  
den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Experi-  
mentelle Cytogenetik".



L e b e n s l a u f

Bernd Beek

|               |                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 21. 1. 1949   | in Berlin geboren                                                                                                                                                                                                 |
| Frühjahr 1955 | Eintritt in die Grundschule                                                                                                                                                                                       |
| Frühjahr 1961 | Eintritt in das Leibniz-Gymnasium<br>(Neusprachlicher Zweig)                                                                                                                                                      |
| Frühjahr 1968 | Abitur, Immatrikulation an der<br>Freien Universität Berlin im<br>Fach Biologie                                                                                                                                   |
| Frühjahr 1970 | Vordiplom in Biologie (Zoologie,<br>Botanik, Chemie, Physik)                                                                                                                                                      |
| Herbst 1971   | Mündliche Diplomprüfung im Fach<br>Biologie (Allgemeine Biologie und<br>Genetik, Hauptfach; Zoologie, Bio-<br>chemie und Molekularbiologie, Ne-<br>benfächer), Beginn der Diplomarbeit<br>am Institut für Genetik |
| Herbst 1972   | Abschluß der Diplomarbeit, Diplom                                                                                                                                                                                 |
| Januar 1973   | Ernennung zum Wissenschaftlichen<br>Assistenten am Institut für Genetik,<br>Beginn der Doktorarbeit                                                                                                               |





